

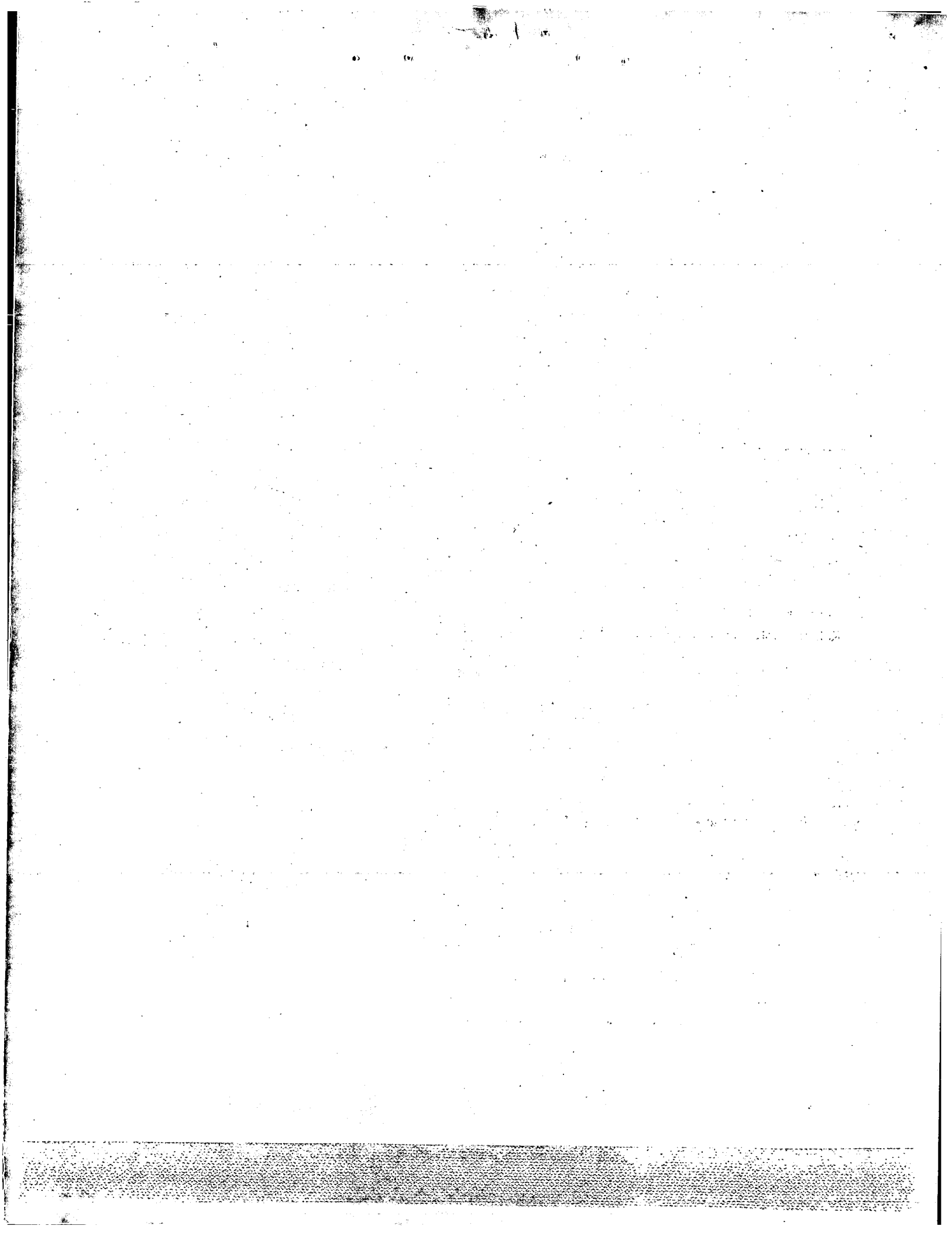
Apparatus for quantitative imaging of multiple fluorophores using dual detectors

Patent Number: ☐ US5418371
Publication date: 1995-05-23
Inventor(s): ASLUND NILS R D (SE); CARLSSON KJELL S (SE)
Applicant(s):
Requested Patent: ☒ EP0681695 (WO9418547), B1
Application Number: US19940189190 19940131
Priority Number(s): US19940189190 19940131; US19930011881 19930201
IPC Classification: G01N21/64
EC Classification: G01N21/64H
Equivalents: DE69402958D, DE69402958T, JP8506419T, ☐ WO9418547

Abstract

A quantitative fluorometer for multiple fluorophores having dual time-modulated beams of excitation light. Each beam is synchronized with a separate detector and lock-in amplifier. The fluorophores are simultaneously excited and the combined fluorescent emission is resolved into components corresponding to each fluorophore. Confocal scanning means are used to excite and detect fluorescent emission from locations throughout a volume. The location specific output of each amplifier is stored in a computer which resolves the emission into the components corresponding to each fluorophore. The location specific data may be further processed or visually displayed. Multiple amplifiers for each detector channel allow phase discrimination in each channel so that prompt and delayed fluorescence may be measured, allowing use of multiple fluorophores in each detector channel.

Data supplied from the esp@cenet database - I2



19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

12 Übersetzung der
europäischen Patentschrift

87 EP 0 681 695 B1

10 DE 694 02 958 T 2

61 Int. Cl.⁶:
G 01 N 21/64
G 02 B 21/00
G 01 N 21/25

21	Deutsches Aktenzeichen:	694 02 958.0
86	PCT-Aktenzeichen:	PCT/IB94/00019
86	Europäisches Aktenzeichen:	94 906 355.6
87	PCT-Veröffentlichungs-Nr.:	WO 94/18547
86	PCT-Anmeldetag:	1. 2. 94
87	Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung:	18. 8. 94
87	Erstveröffentlichung durch das EPA:	15. 11. 95
87	Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA:	2. 5. 97
47	Veröffentlichungstag im Patentblatt:	11. 12. 97

30 Unionspriorität:

11881	01.02.93	US
189190	31.01.94	US

73 Patentinhaber:

Aslund, Nils R.D., Arsta, SE; Carlsson, Kjell S.,
Vallentuna, SE

74 Vertreter:

Kahler, Käck & Fiener, 86899 Landsberg

84 Benannte Vertragstaaten:

AT, CH, DE, DK, FR, GB, IT, LI, NL, SE

72 Erfinder:

gleich Anmelder

54 VORRICHTUNG ZUR QUANTITATIVEN ABBILDUNG VON MEHREREN FLUOROPHOREN

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patentamt inhaltlich nicht geprüft.

DE 694 02 958 T 2

DE 694 02 958 T 2

5 694 02 958.0-08

10

15 Beschreibung

Fachgebiet der Erfindung

Diese Erfindung betrifft eine quantitative
20 Mikrofluorimetrie, insbesondere eine Vorrichtung zur
quantitativen Mikrofluorimetrie, bei der Fluorophore
durch gleichzeitige Anregung bei zwei oder mehr
Wellenlängen quantitativ erfaßt werden.

25

Allgemeiner Stand der Technik

Die jüngste Entwicklung von Fluoreszierende
Indikatorfarbstoffen für biologisch wichtige
30 intrazelluläre Komponenten hat es möglich gemacht, die
zeitabhängige Verteilung dieser Komponenten in intakten
Zellen zu verfolgen. Vergleiche zum Beispiel U.S.-Pat.-
Nr. 5.049.673, 4.849.362 und 4.603.208.

35 Die emittierte Fluoreszenzstrahlung von einem Fluorophor
weist als Reaktion auf eine Anregung bei einer einzelnen
Wellenlänge meistens ein breites Band von Wellenlängen

auf. Emissionsspektren von verschiedenen Fluorophoren überlappen meistens. Auch, wenn Strahlung verschiedener Wellenlängen verwendet wird, um jeden von zwei Fluorophoren anzuregen, können ihre Emissionsspektren
5 noch überlappen.

Fluorophore absorbieren Anregungsstrahlung bei mehr als einer Wellenlänge. Die Absorptionsspektren verschiedener Fluorophore können überlappen. Als eine Konsequenz wird
10 Strahlung einer Wellenlänge, die gewählt wurde, um ein bestimmtes Fluorophor effizient anzuregen, auch in gewissem Umfang andere Fluorophore anregen. Es können spektrale Überlappungen zwischen diesen überlagernd angeregten bzw. querangeregten Emissionsspektren anderer
15 Fluorophore und dem Emissionsspektrum des Fluorophors, das überwiegend durch die gewählte Wellenlänge angeregt wird, auftreten. Zusammengefaßt stellt bei vielen Anwendungen, die mehrere Fluorophore einbeziehen, die Tatsache, daß deren Emissionsspektren meistens überlappen
20 und daß deren Absorptionsspektren auch überlappen können, ein ernstes Problem dar.

Es ist schwierig oder unmöglich, simultane quantitative Messungen der einzelnen Fluorophore durchzuführen.
25 Deshalb ist in der Vergangenheit die simultane Fluoreszenzdetektion vor allem auf Fälle beschränkt gewesen, in denen die Wellenlängenbereiche spektraler Überlappung der Emissionen durch optische Filterung unterdrückt werden können. Dann wird eine Trennung auf
30 Kosten eines Verlusts wertvoller Signalintensität erreicht.

Die unterschiedlichen Emissionsspektren eines einzelnen Fluorophors, die dadurch erhalten werden, daß es bei
35 verschiedenen Wellenlängen angeregt wird, überlappen meistens stark und können durch optische Filterung nicht getrennt werden. Die relativen Intensitäten dieser

Spektren hängen von der Form des Absorptionsspektrums ab. Diese Form kann wertvolle Information über das Fluorophor und seine Umgebung übermitteln. Demgemäß gibt es eine Notwendigkeit, die überlagernde angeregte Emission eines Fluorophors und die Hauptemission getrennt zu messen, wobei Information über die Form des Absorptionsspektrums gesammelt wird. Um dies in dem Fall zu erreichen, wenn zwei verschiedene Fluorophore vorhanden sind und zwei Anregungswellenlängen gleichzeitig angewendet werden, müssen die einzelnen Beiträge von jedem Fluorophor getrennt gemessen werden. Dies kann nicht ausschließlich durch optische Filterung erreicht werden.

Wenn ein Fluorophor durch Licht angeregt wird, das eine sinusförmig modulierte Intensität aufweist, ist die emittierte Fluoreszenz auch sinusförmig moduliert. Die Modulationsfrequenzen sind die gleichen aber die Phase der emittierten Fluoreszenz ist um einen Betrag verschoben, der in Zusammenhang mit der Lebensdauer des angeregten Zustand des Fluorophors steht. U.S.-Pat. Nr. 4.937.457 von Mitchell offenbart ein Frequenzbereichspektrofluorimeter, das eine einzige Anregungswellenlänge, die mit mehreren, harmonisch in Zusammenhang stehenden, phasensynchronisierten Frequenzen moduliert wird, um gleichzeitig die spektrale Reaktion und die Phasenverschiebung eines einzelnen Fluorophors auf dem gesamten Bereich der verwendeten Modulationsfrequenzen zu bestimmen. Die erzeugten Daten werden verwendet, um die Lebensdauer der Fluoreszenz eines Fluorophors zu bestimmen.

Im U.S.-Pat. Nr. 5.032.714 von Takahashi et al. wird eine Lichtwellenformmeßvorrichtung zum Messen der Lebensdauer von Fluoreszenzlicht, daß durch gepulste Laseranregung erzeugt wird, verwendet. Zwei Laserstrahlen verschiedener Frequenz, von denen wenigstens einer gepulst ist, werden verwendet, um einen Strahl einer einzigen gepulsten

Frequenz, der aus dem Summenfrequenzmischen der Strahlen ausgewählt wurde, zu erzeugen. Der Ausgangsstrahl ist mit derselben Rate gepulst wie der gepulste Eingangsstrahl, der verwendet wird, um einen Einzelphotonendetektor oder
5 eine Streak-Kamera auszulösen. Der Detektor wird dabei mit dem Anregungsstrahl synchronisiert.

Eine Identifikation und Unterscheidung mehrerer Fluorophore in einer Probe wird in U.S.-Pat. Nr.
10 5.047.321 von Loken et al. offenbart. Jede Komponente muß eine unterscheidbare, charakteristische Peakemissionswellenlänge aufweisen, auf die der Detektor eingestellt wird. Fluorophore können mit einer einzelnen Wellenlänge oder mit mehreren Wellenlängen angeregt
15 werden, aber eine Erfassung findet in Bereichen statt, in denen die Peakemissionsspektren nicht überlappen.

In U.S.-Pat. Nr. 4.628.026 von Gardell et al. wird ein automatisiertes System zur sequentiellen und
20 alternierenden Anregung eines Probestücks durch zwei unterscheidbare Lichtwellenlängen offenbart. Das System klassifiziert Probestücke basierend auf dem Quotienten der Intensitäten des Fluoreszenzlichtes, die als Reaktion auf die zwei Anregungswellenlängen von der Probe
25 sequentiell empfangen wird.

Ein gleichzeitiges Aufzeichnen mehrerer Fluorophore, die durch eine einzelne Wellenlänge mittels spektraler Filterung oder Trennung angeregt werden, wird in U.S.-
30 Pat. Nr. 4.833.332 von Robertson Jr. et al. offenbart. Die Fluorophore, die überlappende Emissionsspektren aufweisen, werden durch das Verhältnis ihrer Emissionen unterschieden, die durch zwei spektrale Filter mit komplementären Durchstrahlungsspektren durchgelassen
35 werden. Das System ist zu quantitativen Bestimmungen nicht imstande.

Die Vorrichtungen gemäß dem Stand der Technik, die Fluoreszenz bei nur einer Peakemissionswellenlänge messen, können nicht gleichzeitig mehrere Fluorophore mittels der Gesamtemission von jedem Fluorophor quantitativ erfassen. Die Vorrichtungen, die zur Unterscheidung mehrerer Fluorophore auf eine spektrale Trennung angewiesen sind, können den Gesamtbeitrag jedes Fluorophors aus dem erfaßten, zusammengesetzten Emissionsspektrum nicht trennen.

10 Eine Verwendung von Lock-in-Verstärkern zur Signalerfassung ist bekannt. Mittels eines Zweiphasen- statt eines Einphasen-Lock-in-Verstärkers kann der Wert des Phasenwinkels aus den Ausgangssignalen des
15 gleichphasigen und des 90°-phasenverschobenen Kanals hergeleitet werden. Dies ist zum Beispiel bei der Cytometrie von Steinkamp und Crissman (1992) verwendet worden, um zwischen Fluorophoren zu unterscheiden, die verschiedene Zerfallszeiten aufweisen. Es ist auch von
20 Morgan et al. (1992) vorgeschlagen worden, daß diese Methode in einem konfokalen Rastermikroskop verwendet werden sollte, um Bilder zu erzeugen, die die Zerfallszeit darstellen, die an jedem Bildpunkt gemessen wurde. Ein nicht-konfokales System, das die
25 Zerfallszeiten bei allen Bildelementen gleichzeitig aufzeichnet, wurde durch Lakowicz und Berndt (1991) realisiert. Bei einem System zum Untersuchen von Objekten in einer kontinuierlich fließenden Lösung, über das Kurtz (1987) berichtet, wird ein einzelnes Fluorophor mittels
30 zweier modulierter Anregungswellenlängen angeregt. Zwei Lock-in-Verstärker werden bei dem System verwendet, das Messungen an einem einzigen Punkt durchführt und keine Bilder erzeugt.

35 Ein anderes Verfahren, um zwischen Fluorophoren mit verschiedenen Zerfallszeiten zu unterscheiden, ist es, eine sich wiederholende Quelle kurzer, optischer Impulse

und ein zeitkorreliertes Einzelphotonenzählen zu verwenden. Dieses Verfahren ist auch mit einer Bildsynthese kombiniert worden. Ein nicht-konfokales System dieser Art wurde durch Morgan und Murray (1991) realisiert. Ein konfokales System mit Zeitabtastung wurde durch Buurman et al. (1992) realisiert.

Der Begriff Fluoreszenzlebensdauerbildsynthese (FLIM) wird, siehe Lakowicz und Berndt (1991), für Methoden verwendet, die eine Kombination von Zerfallszeitmessungen und Bildsynthese darstellen. Auch offenbart eine internationale PCT-Anmeldung WO92/13265 von Lakowicz und Berndt ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Erfassung und Messung physikalischer Merkmale einer Probe basierend auf einer mehrdimensionalen Phasenmodulations-FLIM. Wenigstens eine fluoreszierende Probe, die eine bekannte oder variable Lebensdauer aufweist, wird durch einen intensitätsmodulierten Strahl angeregt und ein Torsteuerungssignal wird verwendet, um das emittierte Sekundärlicht zu vervielfältigen.

Es ist eine Aufgabe, ein verbessertes Mikrofluorimeter vorzusehen, das imstande ist, gleichzeitig mehrere Fluorophore mit höherer Effizienz quantitativ zu erfassen.

Es ist eine andere Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein verbessertes Mikrofluorimeter vorzusehen, das gleichzeitig die Gesamtemissionen mehrerer Fluorophore oder die gesamten Emissionsspektren, möglicherweise mit Ausnahme geringerer Teile, verwendet.

Es ist eine weitere Aufgabe, ein verbessertes Mikrofluorimeter vorzusehen, das imstande ist, die einzelnen Beiträge von Fluorophoren mit überlappenden Absorptionsspektren aus dem erfaßten, zusammengesetzten Emissionsspektrum zu trennen.

Zusammenfassung der Erfindung

- 5 Die obigen Aufgaben wurden mit einem Mikrofluorimeter
gelöst, das an einer einzelnen Stelle mit zwei oder mehr
Wellenlängen gleichzeitig eine Vielzahl von
fluoreszierenden Meßobjekten anregt. Bei dem bevorzugten
Ausführungsbeispiel wird jede Anregungswellenlänge
10 gewählt, um überwiegend eines der Fluorophore anzuregen.
Die Intensität der Anregung bei jeder Wellenlänge wird
bei einer separaten Frequenz zeitmoduliert.
- Bei dem ersten Ausführungsbeispiel wird die Strahlung,
15 die als Reaktion auf die zusammengesetzte Anregung
emittiert wird, in spektrale Anteile getrennt, die
verschiedene Wellenlängenbänder darstellen. Eine optische
Filterung und optische Strahlteilung wird verwendet, um
diese Trennung zu erreichen. Zwei Detektoren werden
20 verwendet, um die separaten, spektralen Anteile der
zusammengesetzten Emission zu erfassen. Ein
frequenzsynchronisierter Verstärker, der auf eine
korrespondierende Modulationsfrequenz synchronisiert
wird, wird mit jedem Detektor verbunden. Die
25 Unterscheidung, die durch die frequenzsynchronisierten
Verstärker durchgeführt wird, zusammen mit der
Auftrennung in spektrale Anteile, die durch optische
Filter und einen Strahlteiler durchgeführt wird,
ermöglichen eine Extraktion und das Messen der Beiträge,
30 die jedes separate Fluorophor exklusiv darstellen. Dies
wird trotz der Tatsache erreicht, daß die
Emissionsspektren der Fluorophore stark überlappen können
und trotz der möglichen Gegenwart überlagernd angeregter
Spektren, die auftreten, wenn die Wellenlänge, die
35 überwiegend ein bestimmtes Fluorophor anregt, auch in
einem gewissen Umfang ein anderes Fluorophor anregt.

Bei einer Variante des ersten Ausführungsbeispiels werden zwei Einphasen-Lock-in-Verstärker mit jedem Detektor verbunden. Die beiden Verstärker werden mit verschiedenen Frequenzen synchronisiert, nämlich den Frequenzen, die
5 verwendet werden, um die Intensität der Anregung bei jeder der zwei Anregungswellenlängen zu modulieren. Alle einzelnen Komponenten der zusammengesetzten Emission, einschließlich überlagernd angeregter Beiträge, werden extrahiert und gemessen.

10

Bei noch einer anderen Variante des ersten Ausführungsbeispiels werden zwei Einphasen-Verstärker, die mit jedem Detektor verbunden sind, verwendet, wobei die zwei Verstärker auf die gleiche Frequenz abgestimmt
15 werden. Die zwei Verstärker, die mit dem einen Detektor verbunden sind, werden beide auf die Frequenz abgestimmt, die verwendet wird, um die Intensität der Anregung bei der einen Anregungswellenlänge zu modulieren; die zwei Verstärker, die mit dem anderen Detektor verbunden sind,
20 werden beide auf die Frequenz abgestimmt, die verwendet wird, um die Intensität der Anregung bei der anderen Anregungswellenlänge zu modulieren. Die Phasenlagen der beiden Verstärker, die mit jedem Detektor verbunden sind, liegen 90° auseinander. Zusammen führen die beiden
25 Verstärker die Funktion eines Zweiphasen-Lock-in-Verstärkers aus, der einen gleichphasigen und einen 90° -phasenverschobenen Kanal einschließt.

30

Die zwei Ausgangssignale von jedem Zweiphasen-Verstärker werden bearbeitet, um den Betrag und den Phasenwinkel des Signals, das an dem Verstärker anliegt, zu erhalten, wobei wohlbekannte Methoden verwendet werden.

35

Vorzugsweise wird dies digital durch eine Datenbearbeitungseinheit durchgeführt, die mit den Ausgängen verbunden ist. Als ein Ergebnis werden die Amplitude des modulierten Signals, das von dem Detektor empfangen wird, und eine Phasenverschiebung hergeleitet.

Der Phasenwinkel stellt in einer relativen Skala die Verschiebung zwischen dem Phasenwinkel der modulierten Anregung und dem Phasenwinkel der erfaßten Emission dar.

- 5 Wenn sich die molekulare Relaxationszeit eines Fluorophors ändert, wie sie es z.B. wegen einer Änderung des pH-Wertes der Umgebung des Fluorophors tun kann, wird sich diese Phasenverschiebung ändern. Der Effekt ist beträchtlich, wenn die Modulationsfrequenz hoch ist.
- 10 Deshalb ist bei der vorliegenden Variante des ersten Ausführungsbeispiels die verwendete Modulationsfrequenz vorzugsweise eine Größenordnung höher als in den früher beschriebenen Varianten. Die Vorrichtung liefert gemäß der beschriebenen Variante gleichzeitig und unabhängig
- 15 die Phasenverschiebungen für zwei verschiedene Fluorophore.

- Bei allen Ausführungsbeispielen kann ein konfokales, optisches Abtastsystem verwendet werden, um Bildpunkt für
- 20 Bildpunkt eines Stapels von Ebenen abzutasten, so daß volumetrische Daten von verschiedenen Fluorophoren gleichzeitig und unabhängig erhalten werden können. Daten können in einem Computer gespeichert und später abgebildet werden. Verschiedene Farben können verwendet
- 25 werden, um Bereiche zu unterscheiden, die verschiedene Intensitäten eines Fluorophors oder, bei einer der Varianten des ersten Ausführungsbeispiels, verschiedene Zerfallszeiten eines Fluorophors darzustellen. In dem letzteren Fall wird ein FLIM-Bild erhalten. Alternativ
- 30 können Farben verwendet werden, um Beiträge von verschiedenen Fluorophoren zu unterscheiden. Ein dreidimensionales Bild des Volumens kann mittels Bildbearbeitungsmethoden, wie z.B. Erzeugen von Projektionen von verschiedenen Winkeln, Vergrößern usw.,
- 35 wieder erzeugt und genau untersucht werden.

- Bei dem zweiten Ausführungsbeispiel der vorliegenden Erfindung wird ein einziger Detektor verwendet. Dieses Ausführungsbeispiel ist relevant in Fällen, in denen die relativen Änderungen der Relaxationszeiten vernachlässigbar sind. Ein separater Lock-in-Verstärker wird mit der Modulationsfrequenz jeder Anregungswellenlänge synchronisiert. Bei einer Variante des zweiten Ausführungsbeispiels werden Zweiphasen-Lock-in-Verstärker verwendet, wobei der gleichphasige Kanal mit einer Phasenlage nahe der des überwiegend durch diese Wellenlänge angeregten Fluorophors abgestimmt ist. Mittels des gleichphasigen und des 90° -phasenverschobenen Ausgangs jedes Verstärkers können alle Komponenten des zusammengesetzten Emissionsspektrums aufgetrennt werden.
- Die Phasenwinkel der Emissionsspektren sind Konstanten, da sich die Relaxationszeiten nicht ändern, und werden aus Daten bestimmt, die in Bereichen erhalten werden, in denen nur eines der Fluorophore vorhanden ist. Diese Bereiche können durch direkte Beobachtung oder durch Analyse des Datensatzes der gesamten Probe identifiziert werden. Die beschriebene Variante des zweiten Ausführungsbeispiels ist demgemäß identisch mit einer Variante des ersten Ausführungsbeispiels, bei der zwei Einphasen-Verstärker mit jedem Detektor verbunden werden und die beiden Verstärker, die mit jedem Detektor verbunden sind, beide auf die gleiche Frequenz abgestimmt werden.
- Bei einer anderen Variante des zweiten Ausführungsbeispiels wird ein Einphasen-Lock-in-Verstärker für jede Anregungswellenlänge verwendet. Die Phasenlage des Verstärkers wird auf die Position abgestimmt, die einen maximalen Ausgangswert für die Fluoreszenz, die durch das überwiegend angeregte Fluorophor emittiert wird, ergibt. Mittels Einphasen-Verstärker können die Emissionsspektren, die jedem

überwiegend angeregten Fluorophor entsprechen, unterschieden werden.

5 Ein Vorteil des Mikrofluorimeters ist, daß mehrere Fluorophore gleichzeitig und unabhängig mit höherer Effizienz quantitativ erfaßt werden.

10 Ein anderer Vorteil ist, daß Beiträge von verschiedenen Fluorophoren trotz eines Überlappens ihrer Emissionsspektren und trotz einer Interferenz von überlappend angeregten Spektren mit vernachlässigbarem Informationsverlust gemessen werden.

15 Ein anderer Vorteil ist, daß alle Beiträge von jedem Fluorophor, einschließlich überlappend angeregter Spektren, gleichzeitig gemessen werden können.

20 Ein weiterer Vorteil ist, daß Fluoreszenzlebensdauerbilder von verschiedenen Fluorophoren gleichzeitig aufgezeichnet werden.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

25 Fig. 1 ist ein schematisches Blockdiagramm eines quantitativen Zwei-Detektor-Mikrofluorimeters gemäß unserer Erfindung.

30 Figuren 2a-d sind graphische Darstellungen, die einzelne Spektralkomponenten eines zusammengesetzten Emissionsspektrums zeigen.

35 Fig. 3 ist ein schematisches Blockdiagramm einer ersten Variante der Vorrichtung aus Fig. 1, die als Merkmal zwei Lock-in-Verstärker für jeden Detektor aufweist.

Fig. 4 ist ein schematisches Blockdiagramm einer zweiten Variante der Vorrichtung aus Fig. 1, die als Merkmal zwei Lock-in-Verstärker für jeden Detektor aufweist, die sowohl zur Phasenunterscheidung als auch zur Frequenzunterscheidung konfiguriert ist.

Fig. 5 ist ein schematisches Blockdiagramm eines quantitativen Einzeldetektor-Mikrofluorimeters gemäß unserer Erfindung.

Figuren 6a-d sind graphische Darstellungen, die einzelne Spektralkomponenten eines zusammengesetzten Emissionsspektrums zeigen.

Figuren 7a-d sind diagrammartige Darstellungen einer Phasenbeziehung zwischen der modulierten Anregungswellenlänge und den modulierten Fluoreszenzemissionen zweier Fluorophore für jeden der Lock-in-Verstärker.

Fig. 8 ist ein Vektordiagramm der Phasenwinkel der Komponenten des Ausgangssignals eines Zweiphasen-Lock-in-Verstärkers 1.

Fig. 9 ist ein Vektordiagramm, das das Phasenverhältnis der Komponenten des Ausgangssignals des Zweiphasen-Lock-in-Verstärkers 2 zeigt.

Fig. 10 ist ein schematisches Blockdiagramm einer Variante des zweiten Ausführungsbeispiels der vorliegenden Erfindung, die Einphasen-Lock-in-Verstärker verwendet.

Detaillierte Beschreibung der bevorzugten Ausführungsbeispiele

Mit Bezug auf Fig. 1 wird ein schematisches Blockdiagramm des ersten Ausführungsbeispiels des quantitativen Mikrofluorimeters gezeigt, das zwei Anregungswellenlängen, zwei Detektoren und zwei Lock-in-Verstärker verwendet. Monochromatisches Anregungslicht verschiedener Wellenlängen wird durch ein Lichtquellenpaar 12 und 14 vorgesehen. Bei dem bevorzugten Ausführungsbeispiel sind die Lichtquellen 12 und 14 separate Diodenlaser, obwohl irgendeine Quelle elektromagnetischer Strahlung, die in der Intensität zeitmoduliert werden kann, verwendet werden kann. Die Intensität der Lichtquelle 12 wird durch einen Modulator 16 gesteuert, der bei einer Sinusfrequenz ν_1 betrieben wird. Auf ähnliche Weise wird die Lichtquelle 14 durch einen zweiten Modulator 18 gesteuert, der bei einer sinusförmigen Frequenz ν_2 betrieben wird. Bei bevorzugten Ausführungsbeispielen kann die Kombination der Lichtquelle 12 und des Modulators 16 alternativ durch einen kontinuierlichen Gaslaser, gefolgt von einem elektrooptischen oder akustooptischen Modulator, der bei einer Frequenz ν_1 betrieben wird, realisiert werden. Ebenso kann die Kombination der Lichtquelle 14 und des Modulators 18 durch einen kontinuierlichen Gaslaser, gefolgt von einem elektrooptischen oder akustooptischen Modulator, der bei einer Frequenz ν_2 betrieben wird, realisiert werden. Bei bevorzugten Ausführungsbeispielen sollten diese Modulatoren imstande sein, bei Frequenzen bis zu 50 MHz betrieben zu werden, um Phasenverschiebungsmessungen entsprechend einem der bevorzugten Ausführungsbeispiele abzudecken. Realistische Werte der Modulationsfrequenzen bei den anderen Ausführungsbeispielen sind 2,2 und 3,0 MHz. Einzelne Lichtstrahlen von den Lichtquellen 12 und 14 werden in einem Strahlenkombinator 20 vereinigt bzw. überlagert.

Der vereinigte Strahl durchläuft einen Strahlteiler 22, der Licht bei den Anregungswellenlängen λ_1 und λ_2 durchläßt. Ein Scanner 24 bzw. Abtaster führt den vereinigten Strahl sequentiell an Stellen bei einer Probe 26. Ein realistischer Wert der Abtastfrequenz des Scanners ist 100 kHz. Bei dem bevorzugten Ausführungsbeispiel ist der Scanner 24 ein konfokales Lasermikroskop, obwohl eine jegliche Vorrichtung, die imstande ist, Anregung auf eine bestimmte Stelle der Probe 26 zu fokussieren und emittierte Strahlung von einer diskreten Stelle der Probe 26 zu sammeln, verwendet werden kann. Die Probe 26 kann irgendein lichtdurchlässiges Objekt sein, das mehrere Fluorophore enthält. Solche Objekte schließen biologische Zellen und zweidimensionale Gele, die zum Trennen von Mischungen oder Schalenkulturen und ähnlichem verwendet werden, ein.

Die zusammengesetzte Fluoreszenz, die als Reaktion auf die Anregung an dem Brennpunkt des Scanners 24 emittiert wird, wird von dem Scanner 24 gesammelt und zum Strahlteiler 22 geführt, der ein frequenzselektives Element aufweist, und dann durch einen anderen Strahlteiler 102 durchgeleitet, der emittierte Fluoreszenz zu den beiden Detektoren 114 und 116 umlenkt. Die Detektoren 114 und 116 können irgendeine Vorrichtung sein, die als Reaktion auf die durch die Fluorophore emittierten Photonen ein Signal erzeugt. Photomultiplier, die Photonen in elektrische Signale umwandeln, sind Beispiele solcher Vorrichtungen. Das halbreflektierende bzw. teildurchlässige Element des Strahlteilers 102 kann ein frequenzselektiver Spiegel sein, der sowohl eine Strahlteilung als auch eine spektrale Trennung durchführt. Zusätzlich können optische Filter 104 und 106 verwendet werden. Der Effekt der optischen Filterung, die entweder durch ein frequenzselektives Element, das in einem Strahlteiler 102 enthalten ist, oder durch optische Filter 104 und 106 oder zusammen durch diese Elemente

durchgeführt wird, ist, das gesammelte Licht in zwei Teile aufzutrennen, die verschiedene Wellenlängenbänder darstellen. Diese Teile werden auf die Detektoren 114 beziehungsweise 116 aufgeteilt. Die Detektoren 114 und 116 können jegliche Detektoren sein, die als Reaktion auf die durch die Fluorophore emittierten Photonen ein elektrisches Signal erzeugen. Photomultiplier, die Photonen in elektrische Signale umwandeln, sind Beispiele solcher Vorrichtungen. Die Signale, die durch die Detektoren 114 und 116 erzeugt werden, werden an ein Lock-in-Verstärkerpaar 30 und 32 gesendet. Der Lock-in-Verstärker 30 wird mit der Modulationsfrequenz ν_1 , die der Lichtquelle 12 von dem Modulator 16 aufgeprägt wird, synchronisiert. Ähnlich wird der Lock-in-Verstärker 32 mit der Modulationsfrequenz ν_2 , die der Lichtquelle 14 von dem Modulator 18 aufgeprägt wird, synchronisiert. Die Phasenlage jedes Lock-in-Verstärkers wird justiert, um das Ausgangssignal zu maximieren.

Mit Bezug auf die Figuren 2a-d zeigen die Kurven einzelne Spektralkomponenten eines zusammengesetzten Emissionsspektrums, das von zwei Fluorophoren als Reaktion auf eine Anregung durch zwei Wellenlängen emittiert wird. Die Kurven beschreiben ungefähr die Spektren zweier häufig verwendeter Fluorophore: TRITC (Tetraethylrhodaminisothiocyanat) (Fluorophor A) und Lucifergelb (Fluorophor B). λ_1 und λ_2 werden durch Untersuchungen der Absorptionsspektren 42 beziehungsweise 44 der Fluorophore A beziehungsweise B ausgewählt. λ_1 wird gewählt, um überwiegend Fluorophor A anzuregen, während λ_2 gewählt wird, um überwiegend Fluorophor B anzuregen. Fluorophor A erzeugt als Reaktion auf λ_1 ein Fluoreszenzemissionsspektrum 46 (I_A). Fluorophor B erzeugt als Reaktion auf λ_2 ein Fluoreszenzemissionsspektrum 50 (I_B) und als Reaktion auf λ_1 ein geringeres Fluoreszenzemissionsspektrum 52 (I_B). Dieses spätere, überlagernd angeregte Spektrum resultiert

aus der Tatsache, daß die Absorptionsspektren 42 und 44 bei der Wellenlänge λ_1 überlappen. Das zusammengesetzte Emissionsspektrum ist, wie in Fig. 2d gezeigt, als Reaktion auf eine Anregung durch λ_1 und λ_2 aus den überlagerten Spektren 46 (I_A), 50 (I_B) und 52 (I_B) zusammengesetzt.

Der Beitrag 50 (I_B) ist der einzige der drei Emissionen, der mit der Frequenz ν_2 moduliert ist. Das Wellenlängenband 62 (b), das zum Detektor 116 (Detektor 2) abgelenkt wird, wird so gewählt, daß der größte Teil des Spektralbereichs des Beitrags 50 (I_B) eingeschlossen wird. Der gemessene Wert des Beitrags I_B , der demgemäß von jeglichen anderen Beiträgen zu der Gesamtemission abgetrennt wurde, wird dann von dem Ausgangssignal des Lock-in-Verstärkers 32 erhalten.

Die Beiträge 46 (I_A) und 52 (I_B) werden beide mit der Frequenz ν_1 moduliert. Das Wellenlängenband 60 (a), das zum Detektor 114 (Detektor 1) abgelenkt wird, wird so gewählt, daß der Spektralbereich des Beitrags 52 (I_B) ausgeschlossen aber der größte Teil des Spektralbereichs des Beitrags 46 (I_A) eingeschlossen wird. Der gemessene Wert des Beitrags I_A , der demgemäß von jeglichen anderen Beiträgen der Gesamtemission abgetrennt wurde, wird dann als ein Ausgangssignal von dem Lock-in-Verstärker 30 erhalten.

Die Ausgangssignale von den Lock-in-Verstärkern 30 und 32 werden an einen Computer 34 gesendet. Bei den bevorzugten Ausführungsbeispielen ist der Computer 34 ein digitaler Computer und die Ausgangssignale von den Verstärkern 30 und 32 werden vor der Speicherung durch gewöhnliche A/D-Wandler digitalisiert. Die Eingangssignale, die die Beiträge I_A und I_B von diskreten Stellen in der Probe darstellen, werden auf eine ortsspezifische Weise in dem Computer 34 gespeichert und können als ein Digitalbild

auf einem Bildschirm abgebildet werden. Ein Bild, das Fluorophor A darstellt, oder ein Bild, das Fluorophor B darstellt, kann separat abgebildet werden. Alternativ kann ein Bild, das die zwei Fluorophore, z.B. mittels
 5 Farben, um sie voneinander zu unterscheiden, darstellt, gleichzeitig abgebildet werden. Der Computer 34 kann auch Projektionsbilder eines Stapels aufgezeichneter Bilder, die ein dreidimensionales, durchsichtiges Volumen, wie z.B. eine Zelle, die durch zwei verschiedene Fluorophore
 10 gekennzeichnet ist, darstellen, herleiten und solche Projektionsbilder auf eine ähnliche Weise auf einem Bildschirm abbilden. In Fig. 1 sind gespeicherte Daten, die gemessene Werte von I_A und I_B darstellen, zur Visualisierung in digitale Bilder 72 und 78 abgebildet.

15 Mit Bezug auf Fig. 3 sind zwei Lock-in-Verstärker 122 und 124 für den Detektor 114 (Detektor 1) und zwei Lock-in-Verstärker 126 und 128 für den Detektor 116 (Detektor 2) vorgesehen. Die Lock-in-Verstärker 122 und 126 sind auf
 20 einen Modulator 16 (Modulator 1) festgelegt und die Lock-in-Verstärker 124 und 128 sind auf einen Modulator 18 (Modulator 2) festgelegt. Die Phasenlage jedes Lock-in-Verstärkers wird justiert, um das Ausgangssignal zu maximieren.

25 Wie zuvor wird das Wellenlängenband, das zu Detektor 116 (Detektor 2) abgelenkt wird, so gewählt, daß es den größten Teil des Spektralbereichs des Beitrags 50 (I_B) einschließt. Es wird auch größere Teile des Beitrags des
 30 überlagernd angeregten Beitrags 52 (I_b) einschließen. Der Beitrag 50 (I_B) wird mit der Frequenz ν_2 moduliert, während der Beitrag 52 (I_b) mit der Frequenz ν_1 moduliert wird. Der Lock-in-Verstärker 126 wird auf die Frequenz ν_1 festgelegt und der Lock-in-Verstärker 128 wird auf die
 35 Frequenz ν_2 festgelegt. Der gemessene Wert des Beitrags 50 (I_B) wird dann, getrennt von jeglichem der anderen Beiträge, d.h. getrennt von Beitrag 52 (I_b) und von

Beitrag 46 (I_A), die beide mit der Frequenz ν_1 moduliert werden, als ein Ausgangssignal vom Lock-in-Verstärker 128 erhalten. Ebenso wird der gemessene Wert des Beitrags 52 (I_B), getrennt von Beitrag 50 (I_B), der mit der Frequenz ν_2 moduliert wird, und möglicherweise mit einiger Interferenz von Beitrag 46 (I_A), dessen spektraler Bereich in hohem Maße in dem an Detektor 114 (Detektor 1) abgeleiteten Wellenband liegt, als ein Ausgangssignal vom Lock-in-Verstärker 126 erhalten. Wenn diese Interferenz nicht vernachlässigbar ist, kann sie, wie unten erläutert, ausgeglichen werden.

Das an Detektor 114 (Detektor 1) abgelenkte Wellenlängenband wird so gewählt, daß der Spektralbereich des Beitrags 52 (I_B) ausgeschlossen wird aber der größte Teil des Beitrags 46 (I_A), der mit der Frequenz ν_1 moduliert wird, eingeschlossen wird. Der gemessene Wert des Beitrags 46 (I_A) wird, getrennt von allen anderen Beiträgen einschließlich Beitrag 50 (I_B), der mit der Frequenz ν_2 moduliert wird, als ein Ausgangssignal von dem Lock-in-Verstärker 122 erhalten, der auf die Frequenz ν_1 abgestimmt wird.

Der gemessene Wert des Beitrags 46 (I_A) schließt nicht den kleineren Teil dieses Beitrags, der an Detektor 116 (Detektor 2) abgeleitet wird, ein. In Fällen, in denen dieser kleinere Teil, der mit einem beachtenswerten Betrag proportional dem gemessenen Teil ist, der an Detektor 114 (Detektor 1) abgeleitet wird, nicht vernachlässigbar ist, kann er direkt als ein Teil des gemessenen Teils des Beitrags 46 (I_A) erhalten werden, der von Detektor 114 (Detektor 1) erhalten wird. Demgemäß können, wenn nötig, durch Subtraktion dieses Teils gemessene Werte von Detektor 116 (Detektor 2) auf die Interferenz des Beitrags 46 (I_A) hin korrigiert werden. Dieser Vorgang wird vorzugsweise von dem Computer 34 durchgeführt.

Der Zweck des Lock-in-Verstärkers 124, der auf die Frequenz ν_2 abgestimmt wird, ist es, ein Ausgangssignal vorzusehen, das ein gemessener Wert eines möglichen Beitrags I_A ist, der einen überlagernd angeregten Beitrag von Fluorophor A darstellt, der durch die Wellenlänge λ_2 angeregt wird. Dieser Beitrag tritt auf, wenn Absorptionsspektren 42 und 44 auch bei der Wellenlänge λ_2 überlappen. Der Einfachheit halber ist dies in Fig. 4 nicht der Fall. Der Hauptteil des Beitrags I_A befindet sich, wenn er auftritt, innerhalb des Spektralbereichs 60 (a), der an Detektor 114 geleitet wird.

Die Ausgangssignale der Lock-in-Verstärker 122, 124, 126 und 128 werden an den Computer 34 gesendet. Die Eingangssignale an den Computer 34, die die Beiträge I_A , I_a , I_B beziehungsweise I_b von diskreten Stellen in der Probe 26 darstellen, werden auf eine ortsspezifische Weise in dem Computer 34 gespeichert und können als digitale Bilder auf dem Bildschirm abgebildet werden. Wie in der Beschreibung des vorhergehenden Ausführungsbeispiels erläutert, können sie separat oder zusammen und in Projektionsbildern von einem Volumen gezeigt werden. Zusätzlich können Quotientenbilder abgebildet werden, die I_a/I_A oder I_b/I_B darstellen und Information über die Form der Anregungsspektren der Fluorophore A beziehungsweise B übermitteln. In Fig. 3 werden die gespeicherten Daten, die die gemessenen Werte von I_A , I_a , I_B und I_b darstellen, zur Visualisierung in die Bilder 72, 74, 76 und 78 hinein abgebildet.

Eine Variante der Vorrichtung aus Fig. 3 wird in Fig. 4 gezeigt, in der die Lock-in-Verstärker 122 und 124 beide auf den Modulator 16 festgelegt werden und die Lock-in-Verstärker 126 und 128 beide auf den Modulator 18 festgelegt werden. Die Phasenlage des Verstärkers 124 wird relativ zur Phasenlage des Verstärkers 122 um 90°

verschoben und die Phasenlage des Verstärkers 128 wird relativ zur Phasenlage des Verstärkers 126 um 90° verschoben. Die Verstärker 122 und 124 bilden zusammen einen Zweiphasen-Lock-in-Verstärker mit einem
 5 gleichphasigen und einem 90° -phasenverschobenen Kanal. Auf die gleiche Weise bilden die Verstärker 126 und 128 auch solch einen Verstärker. Die Ausgangssignale I' und I'' eines Zweiphasen-Lock-in-Verstärkers bilden die x- und y-Komponenten eines Vektors, der in Polarkoordinaten den
 10 Betrag und den Phasenwinkel des Signals, das am Verstärker anliegt, darstellt. Die Umwandlung, um diesen Betrag und diesen Phasenwinkel von jedem der Zweiphasen-Lock-in-Verstärker zu erhalten, wird von dem Computer 34 durchgeführt.

15 Der Phasenwinkel stellt, abgesehen von einem Versatz (bzw. Offset), der durch Einstellung des Zweiphasen-Lock-in-Verstärkers beseitigt werden kann, die Phasenverschiebung zwischen der Wellenform der
 20 modulierten Anregung und der Wellenform der erfaßten Emission dar. Mit den Modulationsfrequenzen 2,2 und 3,0 MHz und mit Fluorophoren, die häufig zum Kennzeichnen bzw. Markieren verwendet werden, ist der Phasenwinkel sehr klein, in der Größenordnung von wenigen Grad. Er
 25 wird sich nicht beträchtlich von einer Stelle der Probe zu einer anderen ändern. Daher ist die Einstellung der Phasenlage eines Lock-in-Verstärkers zur Maximierung des Ausgangssignals gewöhnlich ziemlich unkritisch. Diese Art von Einstellung muß durchgeführt werden, wenn die Lock-
 30 in-Verstärker von dem zuvor beschriebenen Ausführungsbeispielen verwendet werden. Wenn Modulationsfrequenzen verwendet werden, die viel höher sind, und/oder Fluorophore verwendet werden, die längere Zerfallszeiten aufweisen, können beträchtliche
 35 Phasenverschiebungen auftreten. Dies ist der Fall, der für das vorliegenden Ausführungsbeispiel angenommen wird. Von den Ausgangssignalen der Verstärker 122 und 124 wird

die Phasenverschiebung ϕ_A des Fluorophors A von dem Computer 34 hergeleitet und von den Ausgangssignalen der Verstärker 126 und 128 wird die Phasenverschiebung ϕ_B des Fluorophors B von dem Computer 34 hergeleitet.

5

Der Betrag, der von dem Computer aus den Ausgangssignalen der Verstärker 122 und 124 hergeleitet wurde, ist der gemessene Wert des Emissionsspektrums I_A , der auf eine identische Weise wie in der Spezifikation des Ausführungsbeispiels gemäß Fig. 1 von anderen Beiträgen zur Gesamtemission isoliert wurde. Analog ist der Betrag, der von dem Computer aus den Ausgangssignalen der Verstärker 126 und 128 hergeleitet wurde, der gemessene Wert des Emissionsspektrums I_B . Die Phasenverschiebung ϕ eines Fluorophors ist direkt mit der Zerfallszeit τ des Fluorophors gemäß der Beziehung $\tan \phi = 2\pi \nu \tau$ korreliert, in der ν die Modulationsfrequenz ist. Aus der gemessenen Phasenverschiebung können demgemäß die Zerfallszeiten bestimmt werden. Demgemäß können Zerfallszeiten für jeden Bildpunkt eines abgetasteten Bildes berechnet und abgebildet werden, wobei zusätzlich zu einem Intensitätsbild des Fluorophors auch ein Zerfallszeitbild vorgesehen wird, das alternativ in der Literatur als "Bild der Lebensdauer der Fluoreszenz" bezeichnet wird. Dies wird gleichzeitig und unabhängig für zwei Fluorophore A und B durchgeführt. In Fig. 4 werden gespeicherte Daten, die die gemessenen Werte I_A , ϕ_A , I_B und ϕ_B darstellen, zur Visualisierung in digitale Bilder 72, 73, 78 und 79 hinein abgebildet.

30

Mit Bezug auf Fig. 5 wird ein schematisches Blockdiagramm des zweiten Ausführungsbeispiels des quantitativen Mikrofluorimeters, das zwei Anregungswellenlängen, einen einzigen Detektor und zwei Zweiphasen-Lock-in-Verstärker verwendet, gezeigt. Wie in Fig. 1, die das Zwei-Detektor-Ausführungsbeispiel beschreibt, wird monochromatisches Anregungslicht verschiedener Wellenlängen durch ein

35

Lichtquellenpaar 12 und 14 vorgesehen. Auch wird wie in
 Fig. 1 die Intensität der Lichtquelle 12 von einem
 Modulator 16 gesteuert, der bei einer sinusförmigen
 Frequenz ν_1 betrieben wird, und die Lichtquelle 14 wird
 5 von einem Modulator 18 gesteuert, der bei einer separaten
 Frequenz ν_2 betrieben wird. Bei bevorzugten
 Ausführungsbeispielen sind die Modulatoren 16 und 18
 elektrooptische Modulatoren oder akustooptische
 Modulatoren, die bei Frequenzen von bis zu 50 MHz
 10 betrieben werden. Irgendein Modulator, der bei
 Frequenzen, die vorzugsweise wenigstens zweimal größer
 als die Abtastfrequenz des Mikrofluorimeters sind, kann
 eingesetzt werden. Auf die gleiche Weise wie in Fig. 1
 werden einzelne Lichtstrahlen von den Lichtquellen 12 und
 15 14 in einem Strahlkombinator 20 vereinigt; der vereinigte
 Strahl tritt durch den Strahlteiler 22, der Licht bei den
 Wellenlängen λ_1 und λ_2 durchläßt, und ein Scanner 24
 führt den vereinigten Strahl sequentiell an Stellen
 innerhalb einer Probe 26. Die zusammengesetzte
 20 Fluoreszenz, die als Reaktion auf eine Anregung an dem
 Brennpunkt des Scanners 24 emittiert wird, wird von dem
 Scanner 24 gesammelt und an den Strahlteiler 22 geführt.

In Fig. 5, die das quantitative Mikrofluorimeter mit
 25 einem einzelnen Detektor beschreibt, nimmt dennoch der
 Detektor 28 die Stelle der Detektoren 114 und 116 ein,
 die in dem Zwei-Detektor-Ausführungsbeispiel verwendet
 wurden. Der zweite Strahlteiler 102 wird bei diesem
 Ausführungsbeispiel auch nicht verwendet. Der Detektor 28
 30 sammelt die emittierte Fluoreszenz, die von dem
 Strahlteiler 22 abgelenkt wurde. Das Signal, das von dem
 Detektor 28 erzeugt wurde, wird an ein Lock-in-
 Verstärkerpaar 30 und 32 gesendet. Der Lock-in-Verstärker
 30 wird mit der Modulationsfrequenz ν_1 , die der
 35 Lichtquelle 12 von dem Modulator 18 aufgeprägt wird,
 synchronisiert. Bei dem bevorzugten Ausführungsbeispiel
 sind die Lock-in-Verstärker 30 und 32 Zweiphasen-

Verstärker, die zwei Ausgangssignale erzeugen, die Amplituden der aufgezeichneten Wellenform an Phasenlagen darstellen, die 90° entfernt sind. Die Ausgangssignale von den Lock-in-Verstärkern 30 und 32 werden an einen Computer 34 gesendet. Der Computer 34 speichert auf eine ortsspezifische Weise die Eingangssignale, die jeder diskreten Stelle in der Probe 26 entsprechen, und rekonstruiert mathematisch die einzelnen Spektralkomponenten, die der Anregung jedes Fluorophors durch jede Wellenlänge entsprechen. Wie bei Fig. 1, bei dem bevorzugten Ausführungsbeispiel, ist der Computer 34 ein digitaler Computer und die Ausgangssignale von den Verstärkern 30 und 32 werden vor dem Speichern durch konventionelle A/D-Wandler digitalisiert.

Die Kurven zeigen, nun die Figuren 6a-d betreffend, die einzelnen Spektralkomponenten eines zusammengesetzten Emissionsspektrums, das durch zwei Fluorophore als Reaktion auf eine Anregung mit zwei Wellenlängen emittiert wird. λ_1 beziehungsweise λ_2 werden durch Untersuchung der Absorptionsspektren 142 und 144 der Fluorophore A beziehungsweise B gewählt. λ_1 wird gewählt, um überwiegend das Fluorophor A anzuregen, während λ_2 gewählt wird, um überwiegend das Fluorophor B anzuregen.

Das Fluorophor A erzeugt als Reaktion auf λ_1 ein Hauptfluoreszenzemissionsspektrum 146 (I_{A1}) und als Reaktion auf λ_2 ein geringeres, überlagernd angeregtes Fluoreszenzemissionsspektrum 148 (I_{A2}). Dies resultiert aus der Tatsache, daß die Absorptionsspektren 142 und 144 überlappen. Ähnlich erzeugt das Fluorophor B als Reaktion auf λ_2 ein Hauptfluoreszenzemissionsspektrum 150 (I_{B2}) und als Reaktion auf λ_1 ein geringeres, überlagernd angeregtes Fluoreszenzemissionsspektrum 152 (I_{B1}). Eine Anregung bei der Wellenlänge λ_1 erzeugt eine zusammengesetzte Reaktion 154, die die Summe der Hauptreaktion 146 des Fluorophors A und der überlagernd angeregten Reaktion 152 des Fluorophors B ($I_{A1} + I_{B1}$) ist.

Ähnlich erzeugt eine Anregung bei der Wellenlänge λ_2 eine zusammengesetzte Reaktion 156, die aus der Hauptreaktion 150 des Fluorophors B und der überlagernd angeregten Reaktion 148 des Fluorophors A ($I_{B2} + I_{A2}$) besteht. Ein
 5 zusammengesetztes Emissionsspektrum 140 als Reaktion auf die Anregung mit λ_1 und λ_2 ist aus der Summe der Emissionsspektren 146, 148, 152 und 150 ($I_{A1} + I_{A2} + I_{B1} + I_{B2}$) zusammengesetzt.

- 10 Das Phasenverhältnis zwischen Wellenformen der modulierten Anregungsstrahlen und der korrespondierenden, emittierten Fluoreszenz wird, nun die Figuren 7a-d betreffend, gezeigt. Die Intensitätsmodulation des Strahls, der eine Anregungswellenlänge λ_1 aufweist, wird
 15 durch eine sinusförmige Wellenform 160 dargestellt. Das Fluorophor A reagiert auf λ_1 mit einem sinusförmig modulierten Hauptfluoreszenzsignal 162. Das Fluorophor B reagiert mit einem geringeren, überlappend angeregten Fluoreszenzsignal 164 auch auf λ_1 . Die Frequenzen des
 20 Anregungssignals 160 und der Fluoreszenzsignale 162 und 164 sind die gleichen und werden von dem Lock-in-Verstärker 30 aufgefangen, der mit der Modulationsfrequenz ν_1 von λ_1 synchronisiert ist. Die Phase der emittierten Fluoreszenzwellenform unterscheidet
 25 sich dennoch von der Anregungswellenform. Das Phasenverhältnis zwischen der emittierten Fluoreszenzwellenform und der Anregungswellenform hängt von der Fluoreszenzrelaxationszeit der einzelnen Fluorophore und von der Modulationsfrequenz ab. Der Lock-
 30 in-Verstärker 32 wird mit der Modulationsfrequenz ν_2 von λ_2 synchronisiert. Das Fluorophor B, das überwiegend durch λ_2 angeregt wird, emittiert ein modulierte Hauptfluoreszenzsignal 168, während das Fluorophor A ein geringeres, modulierte, überlagernd angeregtes
 35 Fluoreszenzsignal 170 emittiert. Die Fluoreszenzsignale 168 und 170 weisen die gleiche Frequenz wie die Anregung 166 auf und werden von dem Lock-in-Verstärker 32

aufgefangen. Dennoch unterscheiden sich die Phasen der emittierten Fluoreszenzsignale 168 und 170 von der Phase der Anregung 166.

- 5 Die Vektorkomponenten und Phasenwinkel des gleichphasigen und 90°-phasenverschobenen Kanals der Lock-in-Verstärker 30 beziehungsweise 32 werden, nun die Figuren 8 und 9 betreffend, gezeigt. Für den Verstärker 30 wird das Ausgangssignal des gleichphasigen Kanals durch den Betrag
- 10 I_1' dargestellt und das Ausgangssignal des 90°-phasenverschobenen Kanals wird durch den Betrag I_1'' dargestellt. Das Eingangssignal an den Verstärker 30 wird durch einen Vektor der Amplitude I_1 bei dem Phasenwinkel V_1 an den gleichphasigen Kanal dargestellt. Dieses
- 15 besteht aus der Vektorsumme der Signale, die jedem Fluorophor entsprechen, die durch I_{A1} bei einem Winkel V_{A1} für Fluorophor A und I_{B1} bei einem Winkel V_{B1} für Fluorophor B dargestellt werden. Eine ähnlich Bezeichnung wird bei Fig. 9 verwendet, wobei für die Komponenten des
- 20 Lock-in-Verstärkers 32 der Index 2 den Index 1 ersetzt. Die folgenden Gleichungen werden in dem Computer 34 verwendet, um die Ausgangssignale der Verstärker 30 und 32 in die Vektorkomponenten für die Fluorophore A und B aufzulösen:

25

$$\begin{aligned} I_1' &= I_1 \cos V_1 = I_{A1} \cos V_{A1} + I_{B1} \cos V_{B1} \\ I_2' &= I_2 \cos V_2 = I_{A2} \cos V_{A2} + I_{B2} \cos V_{B2} \quad (E1) \\ I_1'' &= I_1 \sin V_1 = I_{A1} \sin V_{A1} + I_{B1} \sin V_{B1} \\ I_2'' &= I_2 \sin V_2 = I_{A2} \sin V_{A2} + I_{B2} \sin V_{B2} \end{aligned}$$

30

- Die Phasenlage des gleichphasigen Kanals ist abgestimmt, um nahe bei der Position zu sein, die einen Maximalwert für das Ausgangssignal von dem überwiegend angeregten
- 35 Fluorophor ergibt. Demgemäß wird der Lock-in-Verstärker 30 abgestimmt, um überwiegend Signale von Fluorophor A zu erfassen, während der Lock-in-Verstärker 32 abgestimmt

wird, um überwiegend Signale von Fluorophor B zu erfassen.

Um die Winkel V_{A1} und V_{A2} zu bestimmen, ist es notwendig,
 5 Daten von einem Bereich zu sammeln, in dem das Fluorophor A aber nicht das Fluorophor B vorhanden ist. In diesen Bereichen:

$$10 \quad \tan V_{A1} = \frac{I_1''}{I_1'}$$

$$15 \quad \tan V_{A2} = \frac{I_2''}{I_2'}$$

Diese Bereiche können durch direkte Beobachtung oder durch Suchen des Datensets, das den Stellen in der ganzen Probe 26 entspricht, die auf eine ortsspezifischen Weise
 20 in dem Computer 34 gespeichert wurden. Bereiche, in denen das Fluorophor A aber nicht das Fluorophor B vorhanden ist, können durch die Tatsache identifiziert werden, daß I_2'/I_1 in diesen Bereichen minimiert ist.

25 V_{B1} und V_{B2} können auf ähnliche Weise von Bereichen bestimmt werden, in denen das Fluorophor B aber nicht das Fluorophor A vorhanden ist. In jenen Bereichen:

$$30 \quad \tan V_{B1} = \frac{I_1''}{I_1'}$$

$$35 \quad \tan V_{B2} = \frac{I_2''}{I_2'}$$

Bereiche in dem Datenset, in denen das Fluorophor B aber nicht das Fluorophor A vorhanden ist, werden durch die
 40 Tatsache gekennzeichnet, daß I_1'/I_2' minimiert ist.

Nachdem er die Werte für V_{A1} , V_{A2} , V_{B1} und V_{B2} bestimmt hat, kann der Computer 34 die vier simultanen Gleichungen (E1), die vier Unbekannte, I_{A1} , I_{A2} , I_{B1} und I_{B2} , aufweisen, mittels konventioneller numerischer Methoden lösen. Bei den bevorzugten Ausführungsbeispielen werden die hergeleiteten Beträge I_{A1} , I_{A2} , I_{B1} und I_{B2} , die die einzelnen Komponenten des zusammengesetzten Emissionsspektrums 140 darstellen, für jede in der Probe 26 abgetastete Stelle digital in dem Hauptspeicher des Computers 34 gespeichert. Die Daten können von dem Computer 34 als abgebildete Bilder 172, 174, 176 und 178, die in Fig. 5 entsprechend der Komponenten I_{A1} , I_{A2} , I_{B1} beziehungsweise I_{B2} gezeigt werden, ausgegeben werden oder zum weiteren Bearbeiten verwendet werden.

Ein schematische Blockdiagramm einer Variante des zweiten Ausführungsbeispiels der Erfindung, das Einphasen-Lock-in-Verstärker verwendet, wird, nun Fig. 10 betreffend, gezeigt. Wenn die Probe 26 zwei Fluorophore enthält, die verschiedene Relaxationszeiten aufweisen, unterscheiden sich die Wellenformen, die der Fluoreszenzanregung entsprechen die durch die Fluorophore erzeugt werden, in der Phase. Die Phasenlage des Lock-in-Verstärkers 30, der überwiegend die Emission des Fluorophors A aufnimmt, wird auf die Lage abgestimmt, die den Beitrag von der Wellenform, die durch das Fluorophor B erzeugt wird, auslöscht. Die Phasenlage des Lock-in-Verstärkers 32, der überwiegend die Emission des Fluorophors B aufnimmt, wird auf die Position abgestimmt, die den Beitrag von der Wellenform, die durch das Fluorophor A erzeugt wird, auslöscht. Bereiche, in denen ein Fluorophor vorhanden, das andere aber nicht vorhanden ist, werden durch direkte Beobachtung bestimmt.

Bei einer Variante des zweiten Ausführungsbeispiels dieser Erfindung, die Einphasen-Lock-in-Verstärker

verwendet, ist eine zugrundeliegende Annahme, daß für jedes Fluorophor die überlagernd angeregte Emission proportional der Hauptemission ist. Eine solche Annahme ist jedoch bei den Varianten, die bei dem ersten Ausführungsbeispiel der Erfindung dargestellt sind, nicht notwendig. Die Lock-in-Verstärker 30 und 32 werden auf die Lagen abgestimmt, die maximale Leistung von dem überwiegend angeregten Fluorophor ergeben. Der Verhältnisfaktor des überlagernd angeregten Beitrags zu dem Hauptbeitrag wird von Bereichen erhalten, in denen nur ein einziges Fluorophor vorhanden ist. Solche Bereiche können durch Abtasten des Datensets nach Minimalwerten der Quotienten I_2/I_1 und I_1/I_2 erhalten werden. In Fällen, in denen die Fluorophore A und B verschiedene Relaxationszeiten aufweisen, kann der Computer 34 nur die Beträge I_{A1} und I_{B2} herleiten, die einzelne Komponenten des zusammengesetzten Emissionsspektrums 140 darstellen. Die Daten können von dem Computer 34 als abgebildetes Bild 172 für I_{A1} von Fluorophor A und 174 für I_{B2} von Fluorophor B ausgegeben werden.

In den Beispielen, die in Fig. 2 gegeben werden, waren die verwendeten Fluorophore TRITC beziehungsweise Lucifergelb bei 514 beziehungsweise 458 nm. Diese Fluorophore wurden mittels zweier Argonionenlaser von jeweils etwa 1 Watt Ausgangsleistung bei 0,7 MHz beziehungsweise 0,9 MHz moduliert. Die Bildpunktaufnahmerate war 100 kHz

Die Fähigkeit der vorliegenden Erfindung, mehrere Fluorophore gleichzeitig quantitativ zu erfassen, kann in einer Vielzahl von Anwendungen verwendet werden. Diese schließen die quantitative Analyse fluoreszierend gekennzeichneteter Verbindungen, die elektrophoretisch getrennt wurden, wie z.B. die einzelne Basen bei einem DNA-Sequenzieren, ein. Zusätzlich kann die Kinetik von

Reaktionen, die fluoreszierend gekennzeichnete Verbindungen in intakten Zellen umfaßt, verfolgt werden. Zum Beispiel können Bereiche, in denen die Fluoreszenzrelaxationszeit spezielle Werte annimmt, aus
5 aufgezeichneten Bildern extrahiert werden. Dies würde einen völlig neuen Weg eröffnen, mikroskopische Strukturen in drei Dimensionen zu analysieren und quantitativ zu erfassen.

5 694 02 958.0-08

10 P a t e n t a n s p r ü c h e :

15 1. Eine Vorrichtung zum quantitativen Erfassen von fluoreszierenden Meßobjekten durch Anregung mit elektromagnetischer Strahlung mit mehreren, diskreten Wellenlängen, die aufweist:

20 ein Mittel zum Führen von zwei Strahlen mit kontinuierlicher, elektromagnetischer Strahlung, wobei jeder Strahl eine diskrete Wellenlänge aufweist und wobei die Strahlen zusammen auf eine abtastende Weise auf eine Vielzahl von einzelnen Stellen auftreffen, an denen fluoreszierende Meßobjekte vorhanden sind, auftreffen und deren Anregung bewirken;

25 ein Mittel zum Modulieren der Intensität jedes Strahls mit verschiedenen Modulationsfrequenzen, um jedem Strahl eine spezielle, zeitmodulierte Wellenform aufzuprägen;

30 ein Mittel zum Erfassen der zusammengesetzten Fluoreszenzemission von den Meßobjekten als Reaktion auf die Anregung; und

35 ein Demodulationsmittel, das mindestens zwei Lock-in-Verstärker aufweist, wobei jeder Verstärker einer anderen Modulationsfrequenz zugeordnet ist, um die Beiträge, die jeweils mit den Meßobjekten korrespondieren, aus der erfaßten, zusammengesetzten Fluoreszenzemission zu

extrahieren, wodurch die Meßobjekte quantitativ erfaßt werden.

2. Die Vorrichtung nach Anspruch 1, bei der das Mittel zum Erfassen der zusammengesetzten Fluoreszenzemission von den Meßobjekten zwei Detektoren aufweist.

3. Die Vorrichtung nach Anspruch 1, bei der das Mittel zum Erfassen der zusammengesetzten Fluoreszenzemission von den Meßobjekten einen einzigen Detektor aufweist.

4. Eine Vorrichtung zum quantitativen Erfassen von fluoreszierenden Meßobjekten, die räumlich in einer Ebene verteilt sind, durch Anregung mit elektromagnetischer Strahlung mit mehreren, diskreten Wellenlängen, wobei die Vorrichtung aufweist,

ein Mittel zum Führen von zwei Strahlen von elektromagnetischer Strahlung mit verschiedenen, diskreten Wellenlängen zu einer Vielzahl von einzelnen Stellen in einer Ebene, wo fluoreszierende Meßobjekte vorhanden sind, auf eine abtastende Weise, wobei die Anregung der Meßobjekte bewirkt wird;

ein Mittel zum Modulieren jedes Strahls mit verschiedenen Modulationsfrequenzen, um jedem der Strahlen eine spezielle, zeitmodulierte Wellenform aufzuprägen;

ein Mittel zum Sammeln von Strahlung, die von Stellen in der Ebene als Reaktion auf die Anregung ausgestrahlt wird;

ein Mittel zum optischen Trennen von spektralen Anteilen der emittierten Strahlung, wobei die spektralen Anteile mindestens zwei verschiedene Wellenlängenbänder darstellen;

ein Mittel zum unabhängigen Erfassen von Strahlung, die jeden der getrennten, spektralen Anteile der emittierten Strahlung darstellt;

ein Demodulationsmittel, das mindestens zwei Lock-in-Verstärker einschließt, wobei jeder Verstärker

einer anderen Modulationsfrequenz zugeordnet ist, um aus jedem der erfaßten, spektralen Anteile der zusammengesetzten, emittierten Strahlung von mehreren fluoreszierenden Meßobjekten die Beiträge zu extrahieren, die jedem der Meßobjekte entsprechen, wodurch jedes Meßobjekt in der Ebene quantitativ erfaßt wird.

5. Die Vorrichtung nach Anspruch 4, bei der jeder der Strahlen durch einen einzelnen Diodenlaser erzeugt wird, wobei die Intensität jedes Diodenlasers mit einer separaten Frequenz moduliert wird.

6. Die Vorrichtung nach Anspruch 4, bei der das Mittel zum Modulieren jedes Strahls einen elektrooptischen Modulator für jeden Strahl aufweist, wobei jeder Strahl mit einer separaten Frequenz moduliert wird.

7. Die Vorrichtung nach Anspruch 4, bei der das Mittel zum Modulieren jedes Strahls einen akustooptischen Modulator für jeden Strahl aufweist, wobei jeder Strahl mit einer separaten Frequenz moduliert wird.

8. Die Vorrichtung nach Anspruch 4, bei der das Mittel zum unabhängigen Erfassen von spektralen Anteilen der zusammengesetzten Emission zwei Detektoren aufweist und bei der das Mittel zum optischen Trennen von spektralen Anteilen optische Filter aufweist, die so angeordnet sind, daß sie die spektral getrennten Anteile der zusammengesetzten Fluoreszenzemission zu jedem der beiden Detektoren aufteilen.

9. Die Vorrichtung nach Anspruch 8, bei der das Demodulationsmittel separate Demodulationsmittel für jeden der beiden Detektoren aufweist, wobei die Demodulationsmittel für Signale wirksam sind, die die gleichen Frequenzen wie die Modulationsfrequenz eines entsprechenden Strahls aufweisen, und wobei das

Ausgangssignal eines jeden Demodulationsmittels für eine spezielle Phasenposition der modulierten Wellenform spezifisch ist.

5 10. Die Vorrichtung nach Anspruch 9, bei der das Demodulationsmittel einen Einphasen-Lock-in-Verstärker für jeden der beiden Detektoren einschließt, wobei die Verstärker mit der Modulationsfrequenz des entsprechenden Strahls synchronisiert sind.

10

11. Die Vorrichtung nach Anspruch 10, bei der die Phasenposition jedes Einphasen-Verstärkers auf die Position abgestimmt ist, die das Ausgangssignal des Verstärkers für ein entsprechendes, fluoreszierendes Meßobjekt maximiert.

15

12. Die Vorrichtung nach Anspruch 9, bei der das Demodulationsmittel zwei Einphasen-Lock-in-Verstärker für jeden der beiden Detektoren einschließt, wobei einer mit der Modulationsfrequenz einer der anregenden Strahlen synchronisiert ist und der andere mit der Modulationsfrequenz des anderen, wodurch überlagernd angeregte Spektren gleichzeitig und unabhängig gemessen werden.

20

25

13. Die Vorrichtung nach Anspruch 9, bei der das Demodulationsmittel einen Zweiphasen-Lock-in-Verstärker für jeden der zwei Detektoren einschließt, wodurch die Phasenverschiebungen der beiden fluoreszierenden Meßobjekte gleichzeitig und unabhängig gemessen werden.

30

14. Die Vorrichtung nach Anspruch 4, bei der das Mittel zum Sammeln von Strahlung, die an Stellen in der Ebene ausgestrahlt wird, ein konfokales Mikroskop ist.

35

15. Eine Vorrichtung zum quantitativen Erfassen von fluoreszierenden Meßobjekten, die in einem Volumen räumlich verteilt sind, durch Anregung mit elektromagnetischer

Strahlung mit mehreren, diskreten Wellenlängen, wobei die Vorrichtung aufweist,

5 ein Mittel zum Führen von zwei Strahlen von elektromagnetischer Strahlung mit verschiedenen, diskreten Wellenlängen zu einer Vielzahl von einzelnen Stellen auf eine abtastende Weise in einer Abtastebene einer volumetrischen Probe, wo ein oder mehrere fluoreszierende Meßobjekte vorhanden sind, wodurch eine Anregung des Meßobjekts bewirkt wird;

10 ein Mittel zum Modulieren jedes Strahls mit verschiedenen Modulationsfrequenzen, um jedem Strahl eine spezifische, zeitmodulierte Wellenform aufzuprägen;

15 ein konfokales Mittel zum Sammeln von Strahlung, die als Reaktion auf die Anregung an Stellen in der Abtastebene emittiert wird;

ein Mittel zum optischen Trennen von spektralen Anteilen der emittierten Strahlung, wobei die spektralen Anteile mindestens zwei verschiedene Wellenlängenbänder darstellen;

20 ein Mittel zum unabhängigen Erfassen von Strahlung, die jeden der getrennten, spektralen Anteile der emittierten Strahlung darstellt;

25 ein Demodulationsmittel, das mindestens zwei Lock-in-Verstärker einschließt, wobei jeder Verstärker einer anderen Modulationsfrequenz zugeordnet ist, um die Beiträge, die jedem der Meßobjekte entsprechen, aus den erfaßten, spektralen Anteilen der zusammengesetzten, emittierten Strahlung von mehreren fluoreszierenden Meßobjekten zu extrahieren, wodurch jedes Meßobjekt auf der Abtastebene quantitativ erfaßt wird;

30 ein Mittel zum Wechseln von einer Abtastebene der volumetrischen Probe zu einer anderen Abtastebene; und

35 ein Mittel zum Speichern von Daten für eine Vielzahl von Abtastebenen, die die Quantifizierung der fluoreszierenden Meßobjekte in einer volumetrischen Probe darstellen.

16. Die Vorrichtung nach Anspruch 15, bei der jeder der Strahlen durch einen separaten Diodenlaser erzeugt wird, wobei jeder Diodenlaser mit einer separaten Frequenz moduliert ist.

5

17. Die Vorrichtung nach Anspruch 15, bei der das Mittel zum Modulieren jedes Strahls einen elektrooptischen Modulator für jeden Strahl aufweist.

10

18. Die Vorrichtung nach Anspruch 15, bei der das Mittel zum Modulieren jedes Strahls einen akustooptischen Modulator für jeden Strahl aufweist.

15

19. Die Vorrichtung nach Anspruch 15, bei der das Mittel zum unabhängigen Erfassen von spektralen Anteilen der zusammengesetzten Emission zwei Detektoren aufweist und bei der das Mittel zum optischen Trennen von spektralen Anteilen optische Filter aufweist, die so angeordnet sind, daß spektral getrennte Anteile der zusammengesetzten Fluoreszenzemission zu jedem der zwei Detektoren aufgeteilt werden.

20

25

20. Die Vorrichtung nach Anspruch 19, bei der das Demodulationsmittel getrennte Demodulationsmittel für jeden der beiden Detektoren aufweist, wobei die Demodulationsmittel für Signale wirksam sind, die die gleichen Frequenzen wie die Modulationsfrequenz eines entsprechenden Strahls aufweisen, und wobei das Ausgangssignal eines jeden Demodulationsmittels für eine bestimmte Phasenposition der modulierten Wellenform spezifisch ist.

30

35

21. Die Vorrichtung nach Anspruch 20, bei der das Demodulationsmittel einen Einphasen-Lock-in-Verstärker für jeden der beiden Detektoren aufweist, wobei die Verstärker mit der Modulationsfrequenz des entsprechenden Strahls synchronisiert sind.

22. Die Vorrichtung nach Anspruch 21, bei der die Phasenposition jedes der Einphasen-Verstärker auf die Position abgestimmt ist, die für ein entsprechendes, fluoreszierendes Meßobjekt das Ausgangssignal des Verstärkers maximiert.

23. Die Vorrichtung nach Anspruch 20, bei der das Demodulationsmittel zwei Einphasen-Lock-in-Verstärker für jeden der beiden Detektoren einschließt, wobei einer mit der Modulationsfrequenz eines der anregenden Strahlen synchronisiert ist und der andere mit der Modulationsfrequenz des anderen, wodurch überlagernd angeregte Spektren gleichzeitig und unabhängig gemessen werden.

24. Die Vorrichtung nach Anspruch 20, bei der das Demodulationsmittel einen Zweiphasen-Lock-in-Verstärker für jeden der beiden Detektoren einschließt, wodurch die Phasenverschiebungen von zwei fluoreszierenden Meßobjekten gleichzeitig und unabhängig gemessen werden.

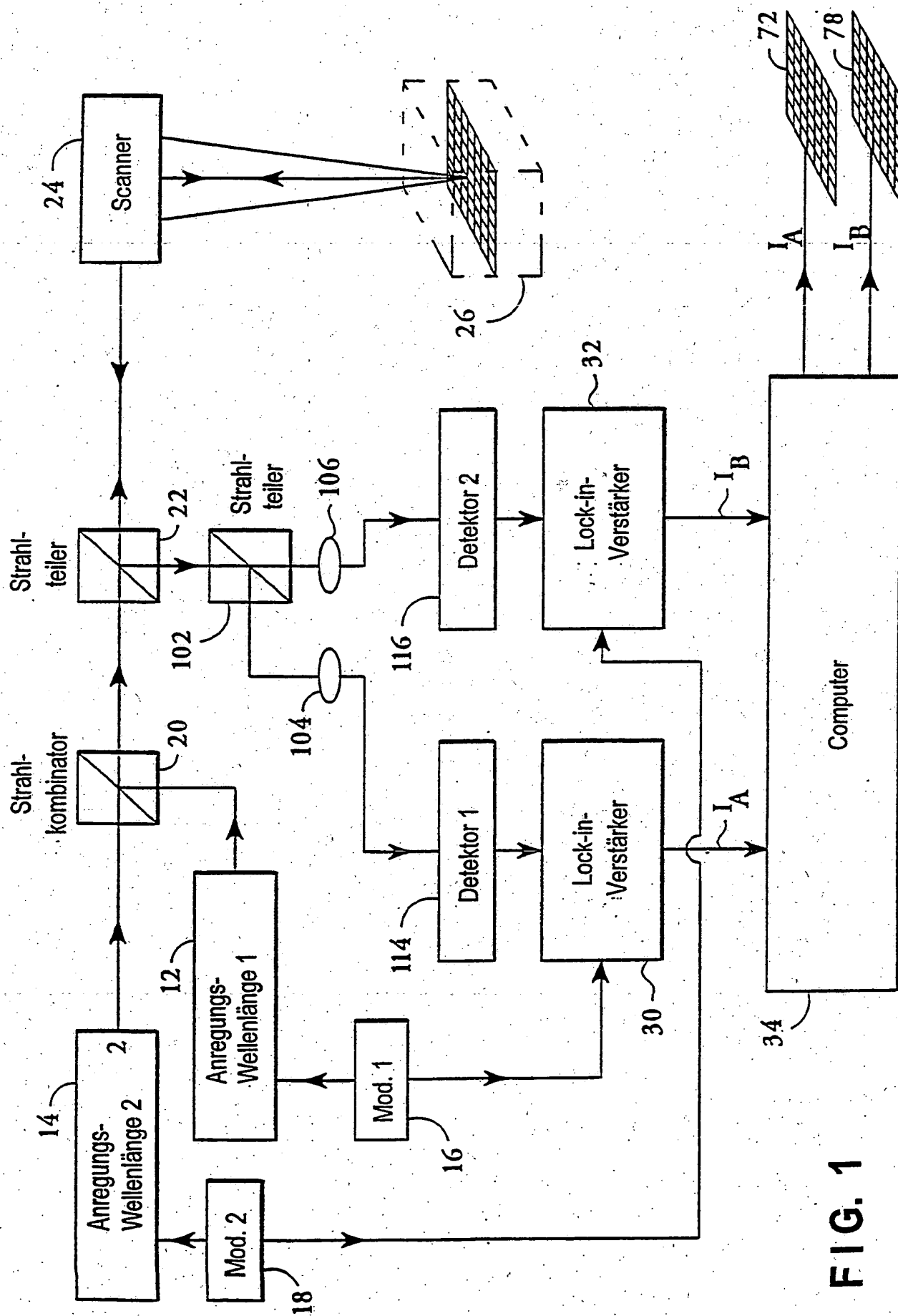


FIG. 1

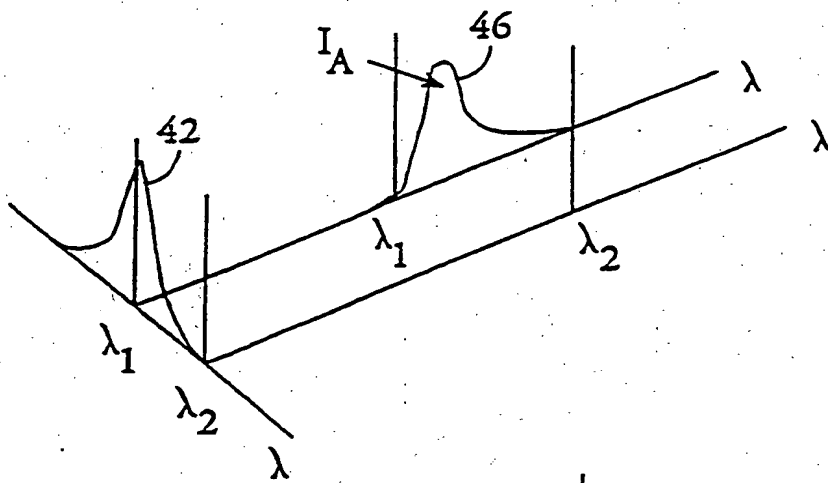


FIG. 2a

FIG. 2b

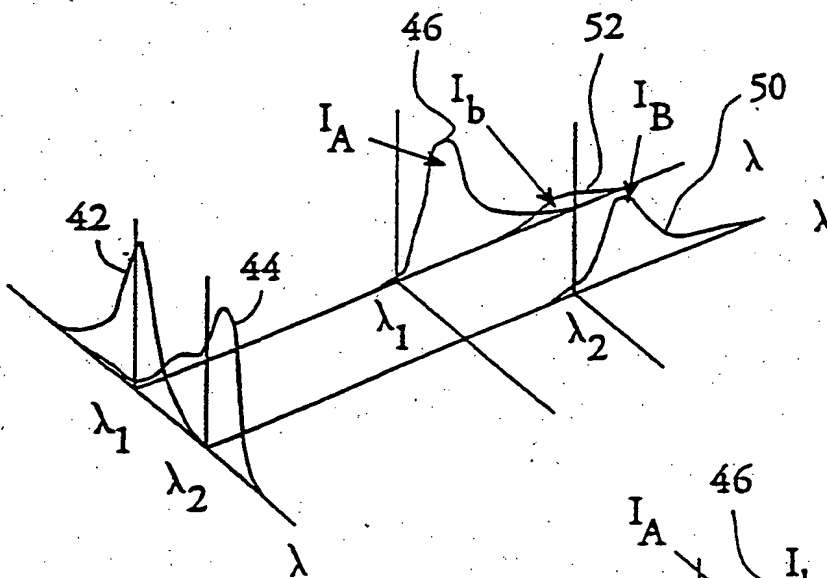
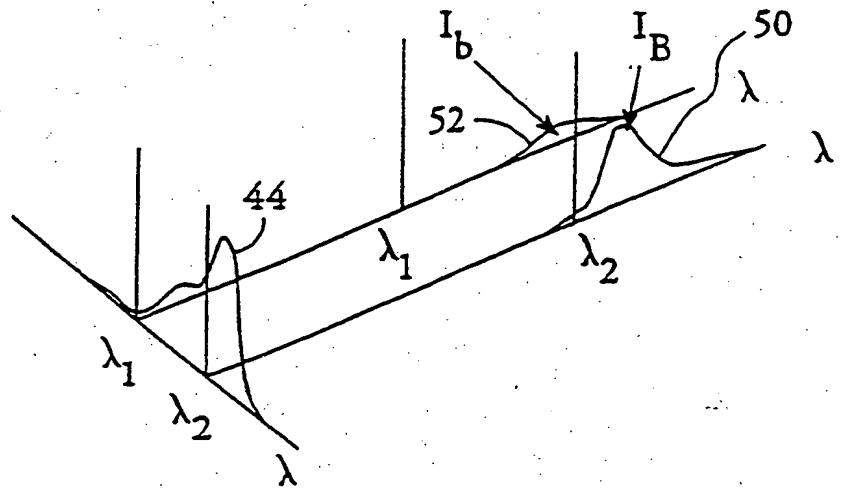
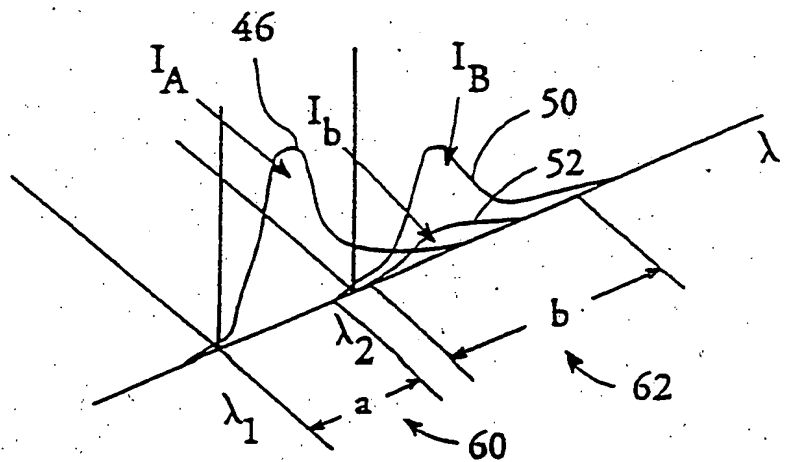


FIG. 2c

FIG. 2d



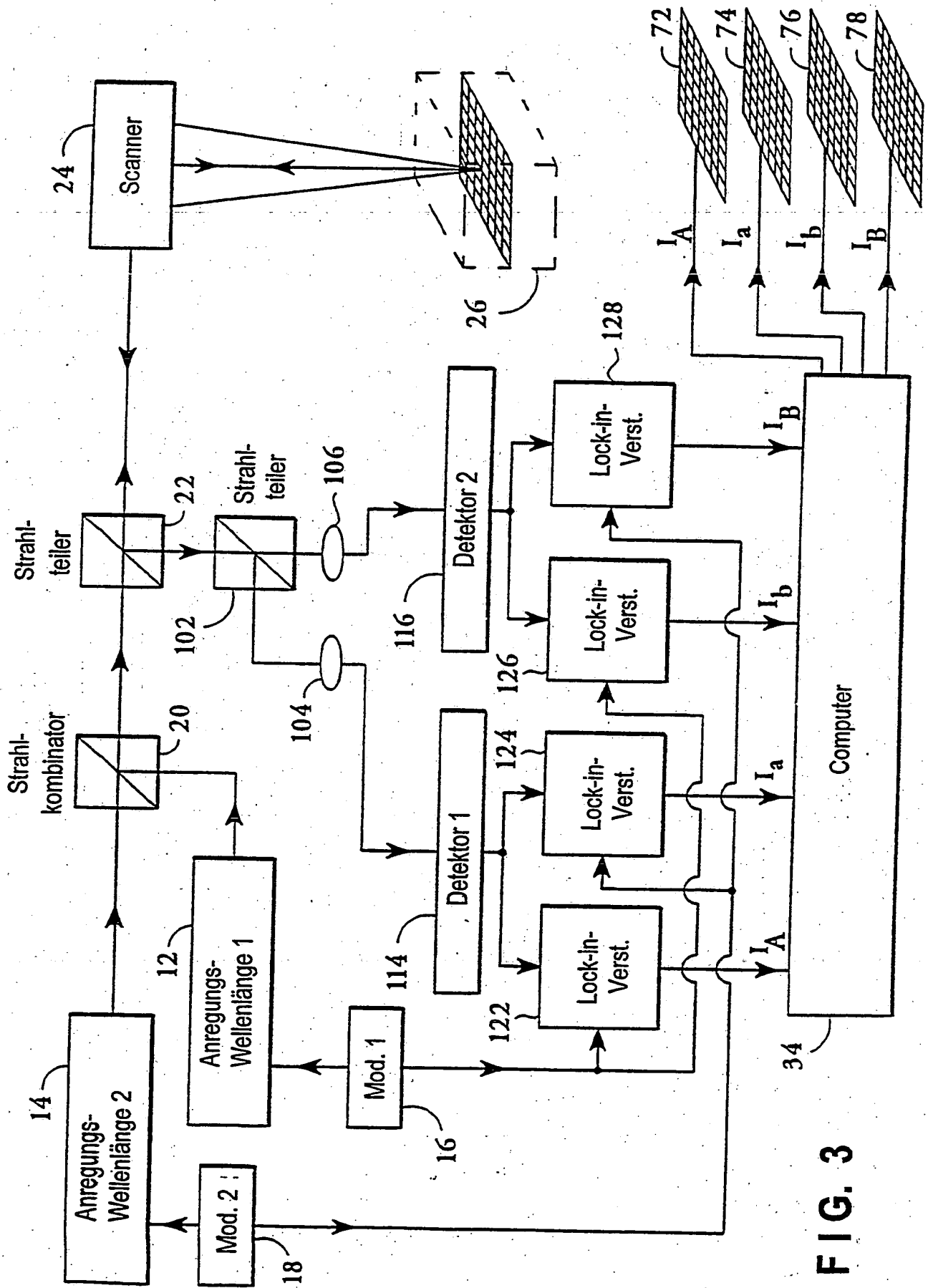
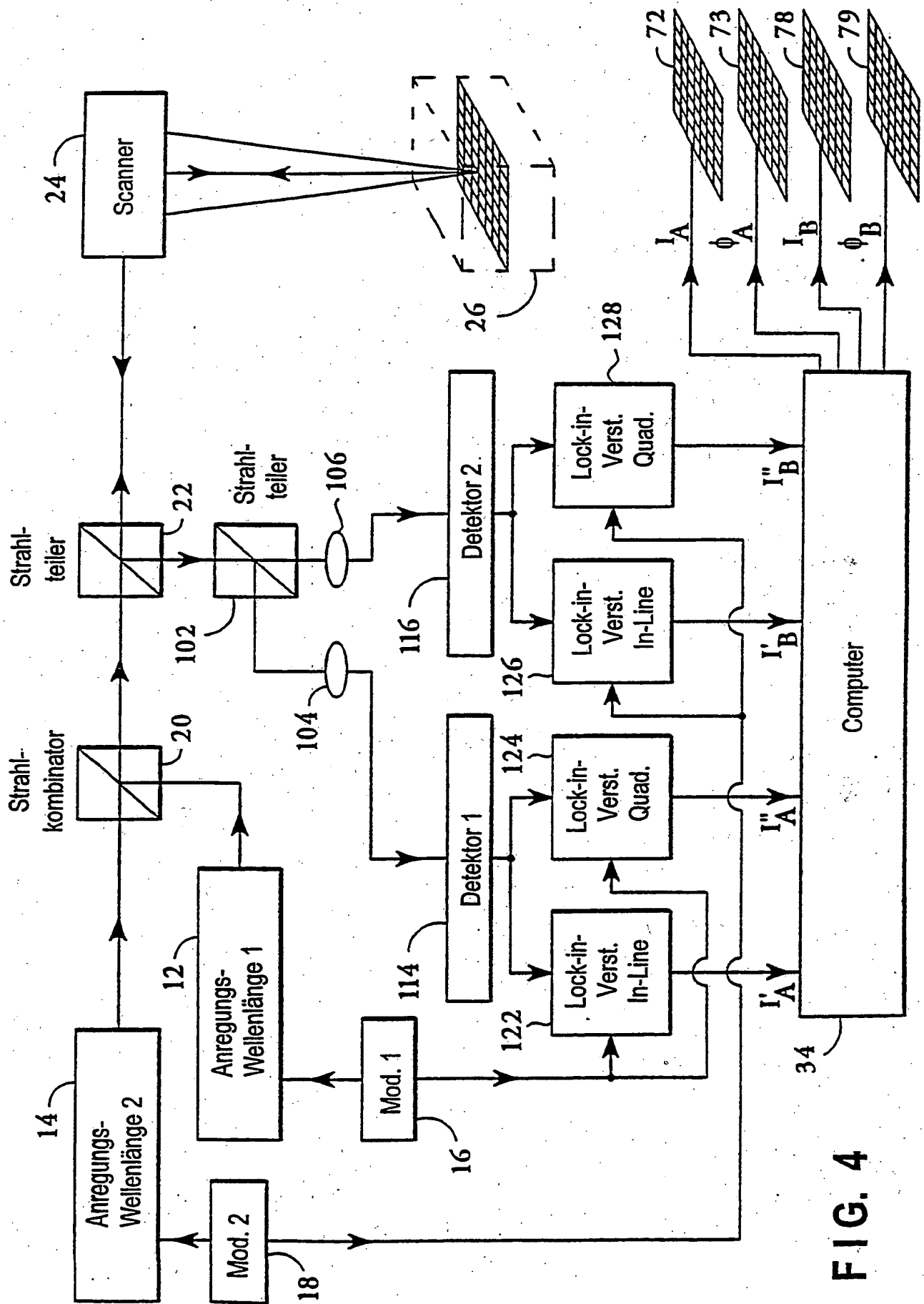


FIG. 3



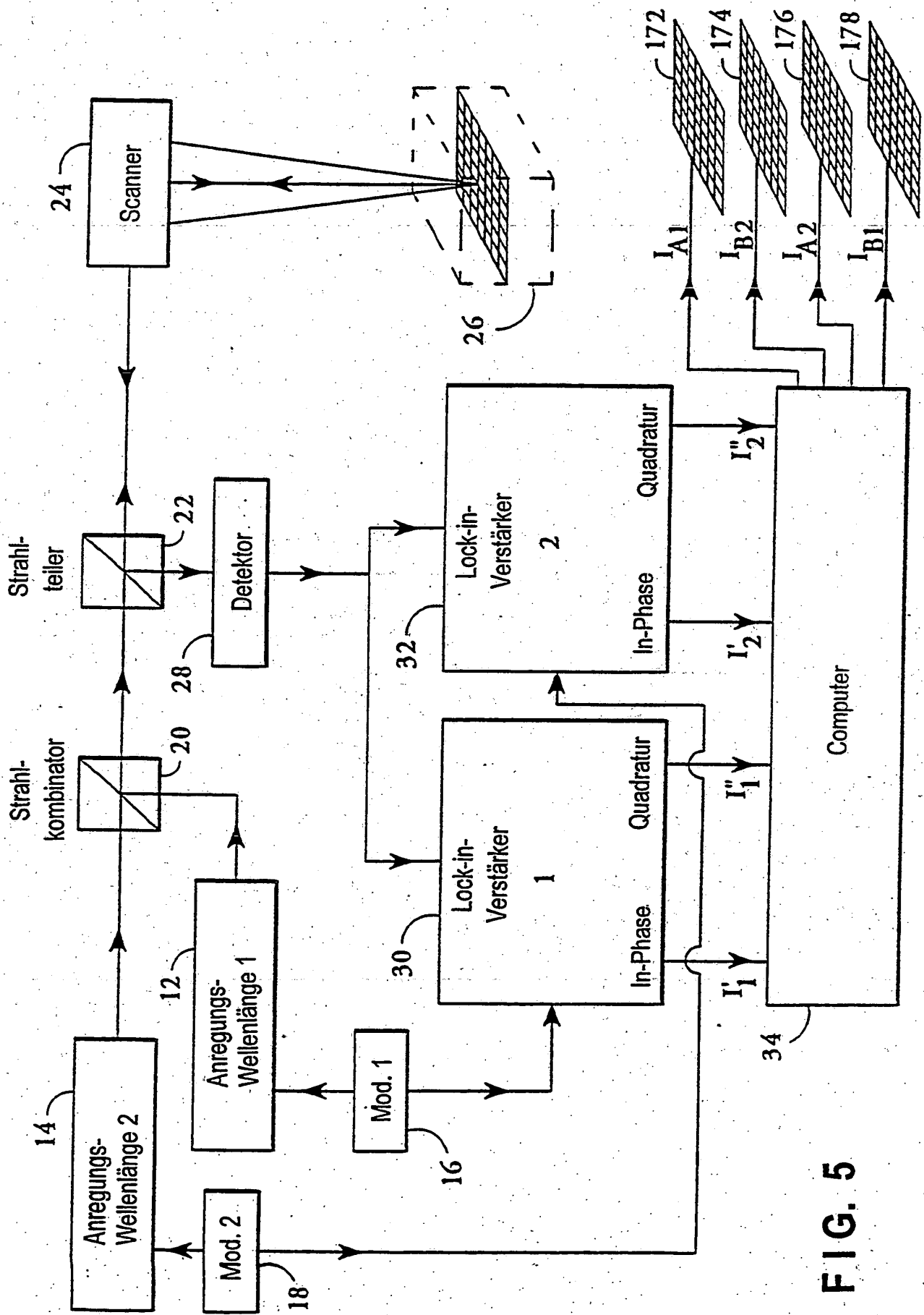


FIG. 5

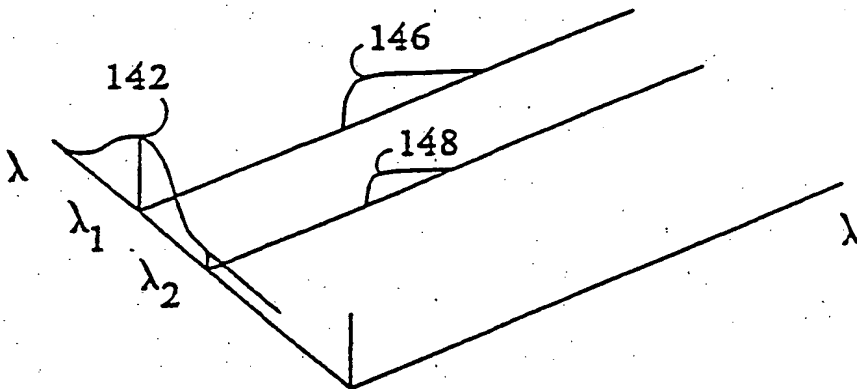


FIG. 6a

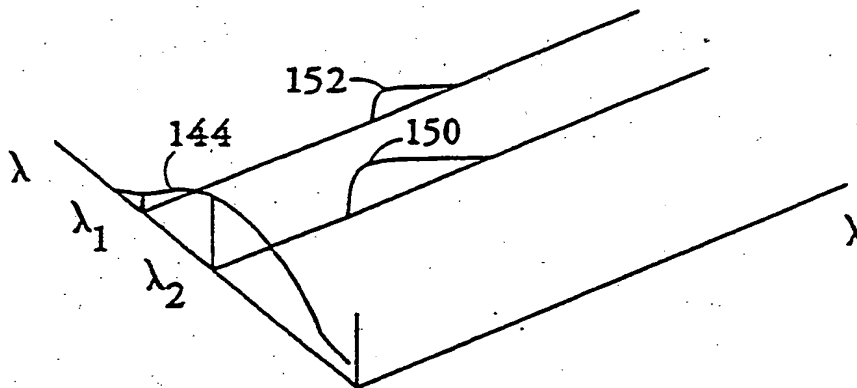


FIG. 6b

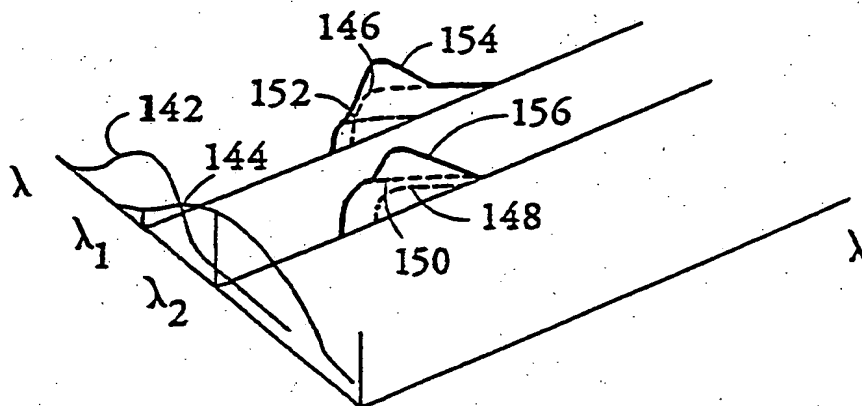


FIG. 6c

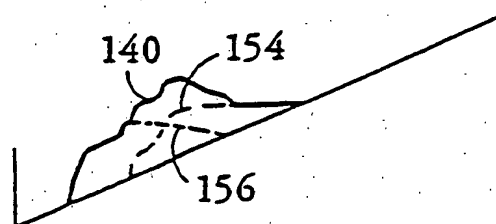


FIG. 6d

Wellenformen

Lock-in-Verstärker 1

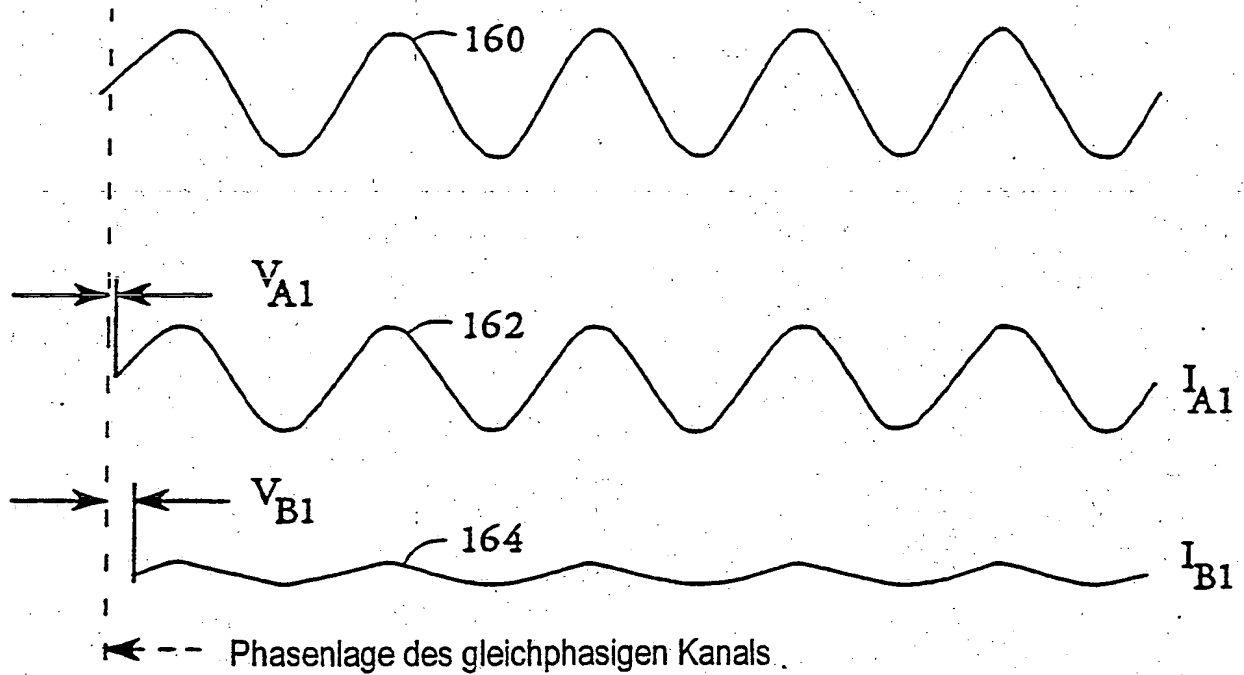


FIG. 7a

Lock-in-Verstärker 2

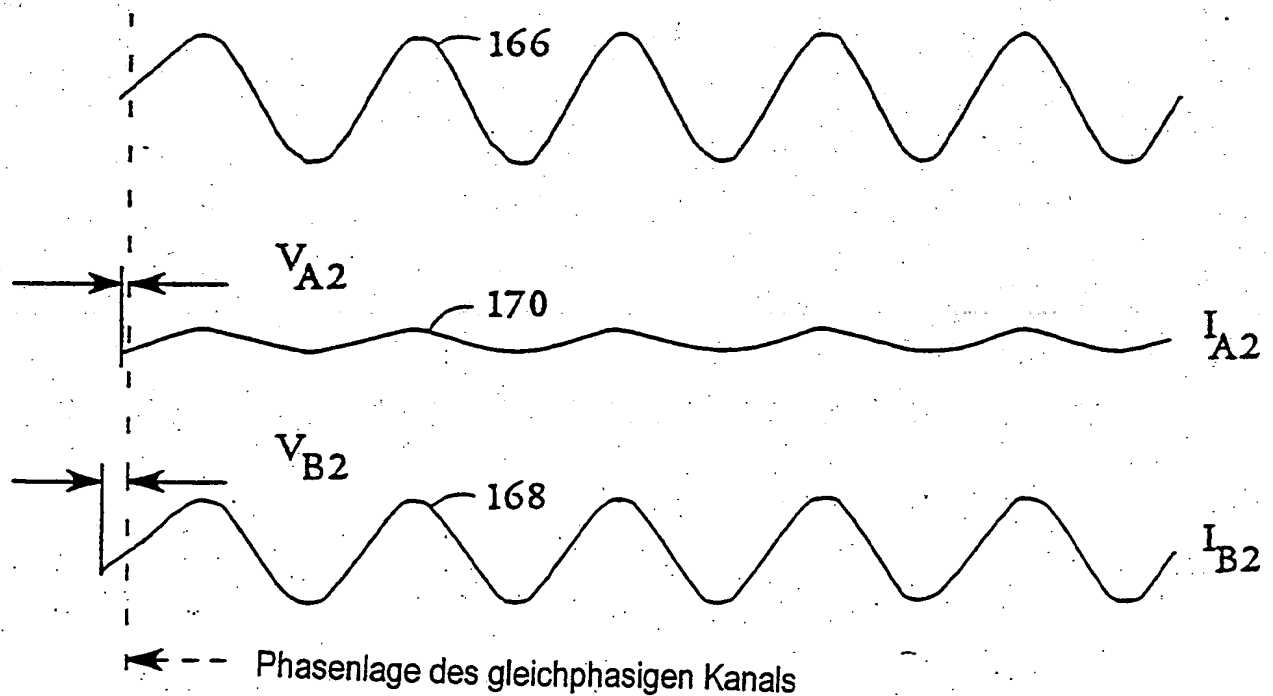


FIG. 7b

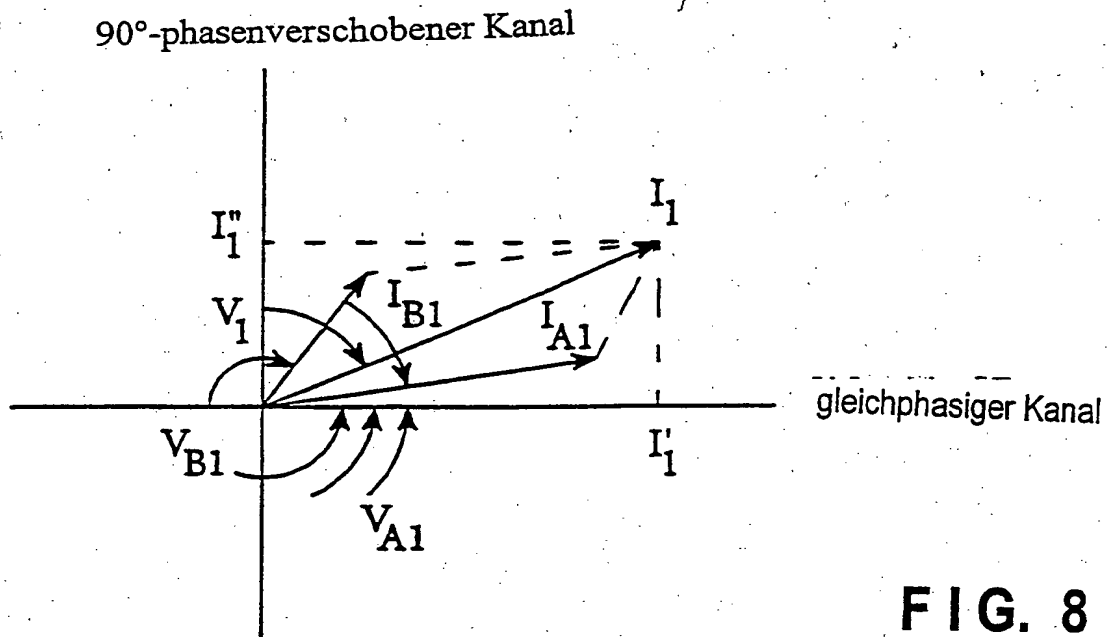


FIG. 8

Lock-in-Verstärker 1

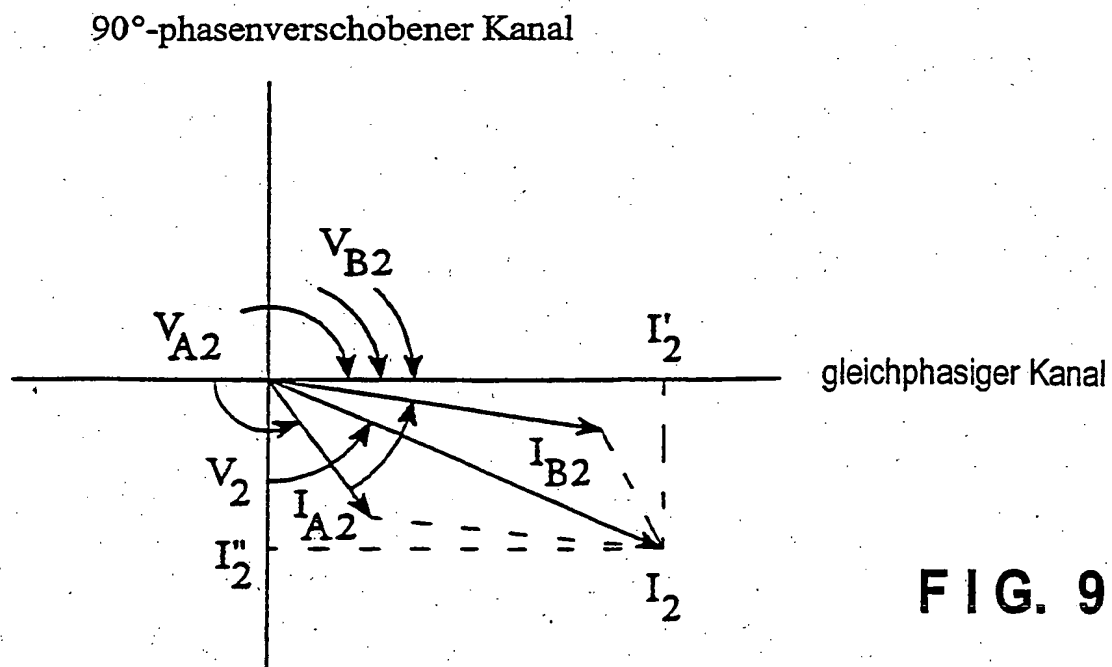


FIG. 9

Lock-in-Verstärker 2

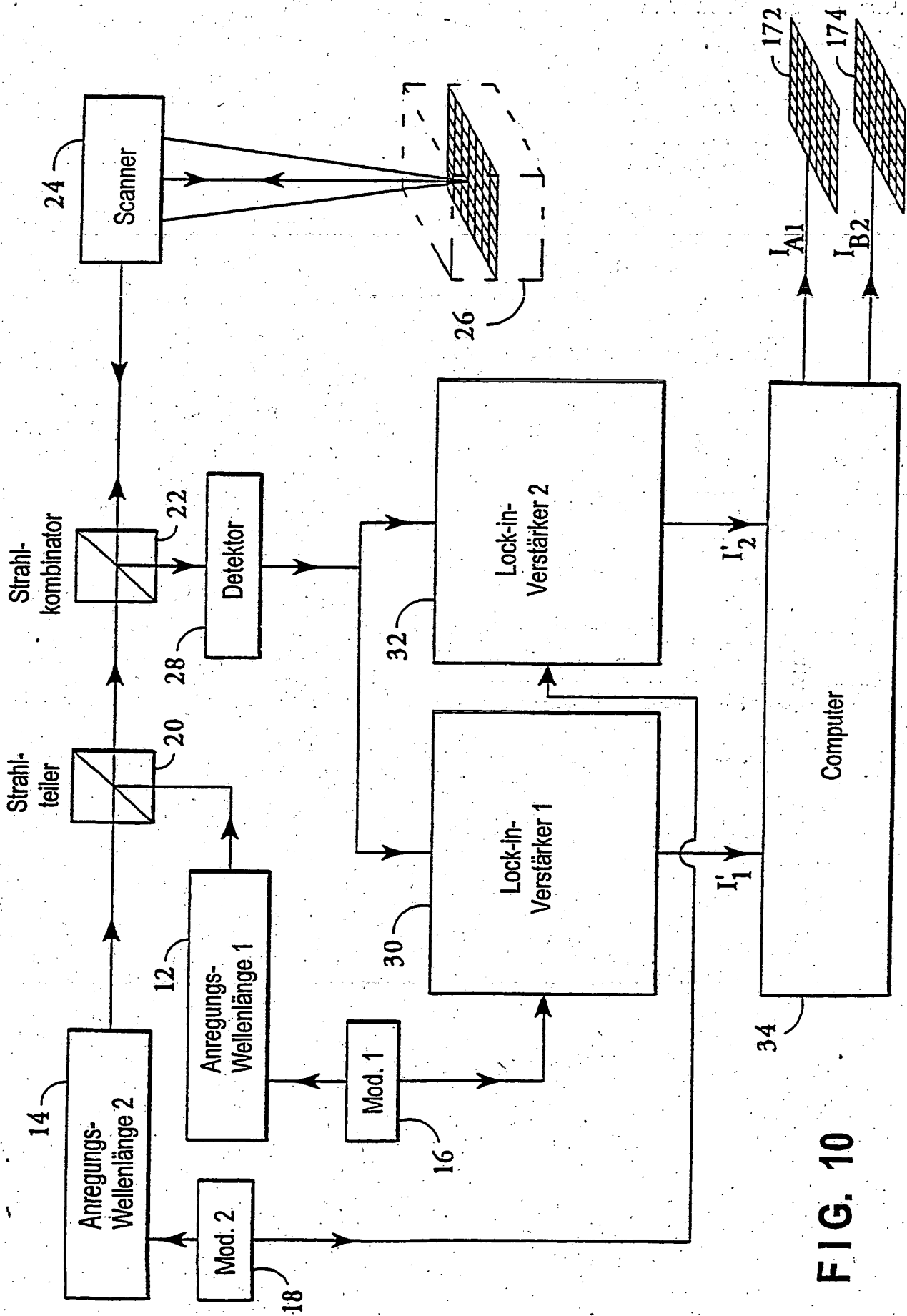


FIG. 10